

Aus der Klinik für Innere Medizin II
des Universitätsklinikums des Saarlandes
Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert

DISSERTATION
Vitamin D-Supplementation bei Patienten mit
nicht alkoholischer Fettlebererkrankung und
Vitamin D-Mangel

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Ifigeneia Papapostoli aus Athen
2017

Dekan:

Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert

Betreuerin: Dr. Caroline S. Stokes

Meinen Kindern:
Christos und Lamprini

Abbildungsverzeichnis

1. Studienablauf-Diagramm
2. Schematische Abbildung der CAP- und LSM-Messung
3. Korrelation des Serum-PTH-Wertes mit der basalen Serum-Vitamin D-Konzentration
4. Individuelle CAP-Werte zur Baseline und nach 4 Wochen
5. CAP-Verlauf
6. Relative CAP-Änderung
7. Vitamin D-Verlauf
8. Individuelle CAP- und Vitamin D-Werte zur Baseline und nach 6 Monaten
9. Serum γ -GT-Aktivität zur Baseline bei starkem und bei mäßigem Vitamin D-Mangel
10. ALT-Verlauf
11. AST-Verlauf
12. γ -GT-Verlauf
13. AP-Verlauf
14. PTH-Verlauf
15. BMI-Verlauf
16. Verlauf der Körpermaße
17. Effekt der Vitamin-Supplementation auf die Vitamin-Konzentration

Tabellenverzeichnis

1. Patientencharakteristika zur Baseline und bei den Verlaufskontrollen
2. Normale vs. erhöhte Leberwerte zur Baseline und bei den Verlaufskontrollen

Abkürzungsverzeichnis

AFLD	Alcoholic Fatty Liver Disease
ALT	Alanin-Aminotransferase
ALD	Alcoholic Liver Disease
ANOVA	Analysis of Variance
AUDIT	Alcohol Use Disorders Identification Test

AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	Body mass index
CAGE	Cut down, Annoyed, Guilty, Eye-opener
CAP	Controlled Attenuation Parameter
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
γ -GT	γ -Glutamyl-Transferase
EDTA	Eethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
EPL	Essential Phospholipid
FFA	Free Fatty Acids
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HDL	High-Density-Lipoprotein
^1H -MRS	^1H -Magnetresonanz-Spektroskopie
IQR	Interquartile Range
ITT	Intention-to-treat
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
MRT	Magnetresonanztomographie
MDB	Mallory Denk Body
LSM	Liver Stiffness Measurement
NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
PNPLA3	Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PP	Per Protocol
PTH	Parathormon
SAMe	S-Adenosyl-Methionin
SPSS	Statistical Package for the Social Sciencest
TE	Transiente Elastographie
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TM6SF2	Transmembrane 6 Superfamily 2

VCTE	Vibration Controlled Transient Elastography
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	World Health Organisation

Inhalt

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	10
1.1	Einleitung.....	10
1.2	Patienten und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	11
1.4	Schlussfolgerungen.....	11
2	SUMMARY	12
2.1	Introduction.....	12
2.2	Patients and Methods	12
2.3	Results	12
2.4	Conclusions.....	13
3	EINLEITUNG	14
3.1	Steatosis hepatis - NAFLD.....	14
3.2	Ätiologie/Klassifikation der NAFLD.....	15
3.3	Prävalenz der NAFLD	15
3.4	Pathophysiologische Mechanismen.....	16
3.5	Diagnostik der NAFLD.....	17
3.5.1	Leberbiopsie als „Goldstandard“	17
3.5.2	Ultraschall.....	18
3.5.3	Transiente Elastographie / Controlled Attenuation Parameter	19
3.6	Vitamin D-Metabolismus.....	20
3.7	Vitamin D Supplementation zur Prävention/Behandlung.....	21
3.8	Ziel und Fragestellungen	22
4	PATIENTEN UND METHODEN	23
4.1	Studiendesign	23
4.2	Studienpopulation.....	23
4.2.1	Einschlusskriterien.....	23
4.2.2	Ausschlusskriterien.....	24
4.3	Intervention.....	24
4.4	Studienablauf	24
4.4.1	Baseline	24
4.4.2	Verlaufskontrollen.....	25
4.5	Beurteilung des Vitamin D-Status	28

4.6	Begleitmedikation	28
4.7	Beurteilung der Compliance.....	28
4.8	Beurteilung der Steatosis hepatis und der Fibrose	29
4.9	Beurteilung des Alkoholkonsums.....	30
4.10	Beurteilung der Körperzusammensetzung.....	31
4.11	Blutentnahme und Laborparameter	32
4.12	Primäre und sekundäre Endpunkte.....	32
4.13	Statistische Analyse	32
5	ERGEBNISSE.....	34
5.1	Patientencharakteristika	34
5.2	Steatosis hepatis.....	37
5.2.1	Ansprechen vs. Nicht-Ansprechen	39
5.2.2	Virushepatitis.....	40
5.3	25-Hydroxyvitamin D-Konzentration	41
5.3.1	Mäßiger vs. starker Vitamin D-Mangel.....	42
5.4	Lebersteifigkeit.....	43
5.5	Leberwerte	44
5.5.1	ALT (Alanin Aminotransferase)/GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase).....	44
5.5.2	AST (Aspartat-Aminotransferase)/GOT (Glutamat-Oxalazetat-Transaminase)	45
5.5.3	γ -GT (γ -Glutamyltransferase)	45
5.5.4	AP (Alkalische Phosphatase).....	46
5.5.5	Normale vs. erhöhte Leberwerte	47
5.6	PTH (Parathormon)	49
5.7	Körperzusammensetzung.....	50
6	DISKUSSION	52
6.1	Signifikante Reduktion der Steatose durch Vitamin D-Supplementation.....	52
6.2	Risikofaktoren für NAFLD/Behandlungsoptionen	53
6.3	Assoziation zwischen NAFLD und Vitamin D-Mangel.....	54
6.4	Effekt der Vitamin D-Supplementation auf die Leber	55
6.5	Pathophysiologie der Wirkung des Vitamins-D auf die Steatose.....	57
6.5.1	Inhibition der hepatozellulären Apoptose	58
6.5.2	Veränderung des Darm-Mikrobioms.....	58
6.5.3	Suppression der proinflammatorischen Zytokine und der Faktoren, die zu oxidativem Stress/Insulinresistenz führen	58

6.6	Vorteile der Studie	59
6.7	Limitationen der Studie	61
6.8	Perspektiven	61
LITERATUR		63
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	71
8	DANKSAGUNG	73
11.	APPENDIX	75
11.1	AUDIT/Cage-Fragebogen	75

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Einleitung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung ist als Steatosis hepatis (Fetteinlagerung in den Hepatozyten) ohne signifikanten Alkoholkonsum definiert. Sie ist die hepatische Komponente des metabolischen Syndroms und in den westlichen Ländern die häufigste Ursache chronischer Lebererkrankungen. Eine neue nicht-invasive Methode zur Quantifizierung der Steatosis hepatis durch die Anwendung von transientser Elastographie ist die Controlled attenuation parameter-Messung. Diese ist eine einfache und vielversprechende Methode, die schon ab Grad I (Fetteinlagerung bei 11 - 33% der Hepatozyten) eine hohe Sensitivität zur Aufdeckung der Steatose aufweist. Die Prävalenz eines Vitamin D-Mangels (Serum-25-Hydroxyvitamin D-Konzentration < 20 ng/ml) beträgt bei Erwachsenen 5% bis 30% und bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen bis zu 90%. Zahlreiche Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung und Vitamin D-Mangel hin. Durch Metaanalysen konnte bei Patienten mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung niedrige Vitamin D-Konzentrationen im Serum belegt werden. Die Hypothese dieser Studie war es, dass eine Vitamin D-Supplementation bei Patienten mit Vitamin D-Mangel und Steatose zu einer quantitativen und durch den Controlled attenuation parameter messbaren Verbesserung der Steatose führt.

1.2 Patienten und Methoden

In diese prospektive, nicht verblindete Studie wurden 40 Patienten eingeschlossen. Die Haupteinschlusskriterien waren eine 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration im Serum < 20 ng/ml und eine signifikante mittels Controlled attenuation parameter quantifizierte Leberverfettung (Werte > 280 dB/m). Patienten mit relevantem Alkoholkonsum und Patienten mit Leberzirrhose wurden ausgeschlossen. Bei den Patienten wurde für sieben Tage eine Therapie mit täglich 20.000 IE Colecalciferol und danach für 6 Monate wöchentlich 20.000 IE durchgeführt. Verlaufskontrollen erfolgten nach vier Wochen, drei Monaten und sechs Monaten. Primärer Endpunkt

war es, Veränderungen der Leberfettkonzentration festzustellen; sekundärer Endpunkt war eine Veränderung bei den Leberwerten.

1.3 Ergebnisse

Es wurden 40 Patienten untersucht, davon waren 19 (48 %) Frauen und 21 (53%) Männer. Der mittlere Alter lag bei $54,9 \pm 12,1$ Jahren und der mittlere Body Mass Index bei $29,5 \pm 3,0$ kg/m². Alle Patienten der Studie waren übergewichtig, 45% davon waren sogar adipös (Body Mass Index > 30 kg/m²). Die mittlere Vitamin D-Konzentration war niedrig und lag bei $11,8 \pm 4,8$ ng/ml. Es konnte unter Vitamin D-Supplementation und im Vergleich zur Baseline eine signifikante ($P = 0,007$) Verbesserung des Controlled attenuation parameter-Wertes beobachtet werden (307 ± 41 vs. 330 ± 32 dB/m). Die mittlere Controlled attenuation parameter-Reduktionen hatten nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten um $5,3 \pm 13,8\%$, $6,0 \pm 14,6\%$ bzw. $6,4 \pm 13,0\%$ abgenommen. Während der Vitamin D-Supplementation konnte bei den Verlaufskontrollen jeweils eine signifikante ($P < 0,0001$) Verbesserung der Vitamin D-Konzentration beobachtet werden ($34,6 \pm 12,9$; $36,3 \pm 10,2$; $34,8 \pm 9,8$ ng/ml). Bei den Leberwerten und der Körperzusammensetzung ließen sich keine signifikante Veränderungen feststellen.

1.4 Schlussfolgerungen

Bei Patienten mit Steatosis hepatis und Vitamin D-Mangel führt die Vitamin D-Supplementation zu einer signifikanten Verbesserung der mittels controlled attenuation parameter quantifizierten Steatosis hepatis, und diese Veränderung tritt bereits nach nur vierwöchiger Intervention auf. Die Steatosis hepatis ist ein dynamischer Prozess, der durch kurzfristige therapeutische Interventionen moduliert werden kann. Durch große randomisierte und kontrollierte Studien sollte dieser Zusammenhang in der Zukunft erhärtet werden.

2 SUMMARY

2.1 Introduction

In Western countries, non-alcoholic fatty liver disease is emerging as the leading cause of chronic liver disease. Patients with non-alcoholic fatty liver disease often display decreased serum 25-hydroxyvitamin D concentrations, as confirmed in meta-analysis. The aim of this intervention study is to assess the effects of vitamin D on hepatic steatosis.

2.2 Patients and Methods

Overall, 40 patients with vitamin D deficiency (serum 25-hydroxyvitamin D < 20 ng/ml) were prospectively recruited from the outpatient liver clinic. Hepatic steatosis was measured using Controlled attenuation parameter during transient elastography. Patients with Controlled attenuation parameter values ≥ 280 dB/m (indicating significant liver fat accumulation) were included. Patients received 20,000 IU vitamin D/week for six months, and during this time vitamin D status, liver function tests, Controlled attenuation parameter and body composition were monitored.

2.3 Results

The cohort comprised of 19 women and 21 men (age 54.9 ± 12.1 years; body mass index 29.5 ± 3.0 kg/m²). Mean serum vitamin D concentration was 11.8 ± 4.8 ng/ml. A significant ($P = 0.007$) decrease in Controlled attenuation parameter from baseline was observed during supplementation (307 ± 41 vs. 330 ± 32 dB/m). Relative to baseline, mean Controlled attenuation parameter reductions for the follow up time periods of four weeks and three and six months were: $-5.3 \pm 13.8\%$; $-6.0 \pm 14.6\%$ and $-6.4 \pm 13.0\%$, respectively. During these time points, mean serum vitamin D concentrations returned to normal levels (34.6 ± 12.9 , 36.3 ± 10.2 , 34.8 ± 9.8 ng/ml; $P < 0.0001$). Liver function tests and body composition did not change.

2.4 Conclusions

Significant improvements in hepatic steatosis, as assessed by CAP, were observed after only 4 weeks of vitamin D supplementation. Hepatic steatosis appears to be a dynamic process, and the use of non-invasive methods can adequately be used to monitor this condition.

3 EINLEITUNG

3.1 Steatosis hepatis - NAFLD

Als Steatosis hepatis (Fettleber) wird eine Fetteinlagerung der Hepatozyten definiert (82). Die Steatosis hepatis ist in der Bevölkerung und bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ein häufiger histologischer Befund und betrifft weltweit ca. 1 Milliarde Patienten (66, 72). Die Steatose kann Folge vielfältiger Ursachen sein, wie Alkoholkonsum, chronische Hepatitis C, metabolischer Dysfunktion (Insulinresistenz, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Hypertriglyzeridämie). Die Prävalenz variiert stark in Abhängigkeit von der untersuchten Population und liegt weltweit bei ca. 25% (109).

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung ist definiert als Steatosis hepatis ohne signifikanten Alkoholkonsum oder andere Ursachen für eine sekundäre Steatose (82). Das häufig verwendete Akronym ist NAFLD (von Non Alcoholic Fatty Liver Disease). NAFLD umfasst ein Spektrum verschiedener Lebererkrankungen, bei denen vermehrt Fetts in der Leber gespeichert wird, und das von der ausschließlichen Steatosis hepatis (nicht-alkoholische Fettleber, nonalcoholic fatty liver NAFL) über die nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) bis zur Zirrhose und zum hepatozellulären Karzinom (HCC) reicht (82). Ca. 30% der NAFLD-Patienten entwickeln eine NASH, wobei die Steatose mit Leberinflammation assoziiert ist. Die erste Beschreibung der NASH, einer bisher unbekannten Leberkrankheit, mit ähnlichen histologischen Charakteristika wie bei der alkoholischen Hepatitis erfolgte 1980 durch Ludwig et al (67). NASH kann eine ausgeprägte Fibrose zur Folge haben, die bei ca. 25% der Patienten zur Leberzirrhose führt (86).

Die Abgrenzung der NAFLD von der alkoholischen Lebererkrankung (ALD) ist nicht einfach, Mischformen sind auch möglich. Aus der Literatur ist eine Schwellendosis von 21 Getränken wöchentlich für Männer und 14 Getränken wöchentlich für Frauen (21, 82) zu entnehmen; die entspricht ≥ 30 g Alkohol täglich für Männer und ≥ 20 g Alkohol täglich für Frauen (21, 36).

3.2 Ätiologie/Klassifikation der NAFLD

Unter Berücksichtigung der Ätiologie werden bei der NAFLD eine primäre, eine sekundäre und eine kryptogene Form unterschieden. Ursache der primären NAFLD ist eine Insulinresistenz als Folge eines Diabetes mellitus Typ 2 oder eines metabolischen Syndroms. Das metabolische Syndrom ist ein Symptomkomplex, der aus Adipositas, als zentralem Merkmal, in Kombination mit mindestens zwei der folgenden Faktoren besteht: Hypertriglyzeridämie (> 150 mg/dl), niedrigem High-Density-Lipoprotein (HDL) ($< 40/50$ mg/dl für Männer/Frauen), arterieller Hypertonie ($\geq 130/85$ mmHg), erhöhten Nüchtern-glucose-Konzentrationen (≥ 100 mg/dl) oder Diabetes mellitus Typ 2 (2, 36). Eine sekundäre NAFLD wird als Begleitphänomen bei mehreren Erkrankungen oder bei Medikamenteneinnahme beobachtet.

Histologisch ist für die nicht alkoholische Steatose die vorwiegend makrovesikuläre Akkumulation von Lipiden im Zytoplasma der Hepatozyten, beginnend zumeist läppchenzentral (perivenulär), charakteristisch. Bei einer Fetteinlagerung $< 33\%$ der Parenchymfläche spricht man von einer geringgradigen (milden) Steatose. Als mittelgradig (mäßig) wird die Steatose bei einer Fetteinlagerung von $33 - 66\%$ und als hochgradig (schwer) bei $> 66\%$ der Parenchymfläche eingestuft (82).

3.3 Prävalenz der NAFLD

Die genaue Prävalenz der NAFLD ist unbekannt. Die in der Literatur beschriebene Prävalenz variiert in Abhängigkeit zur untersuchten Bevölkerung und der verwendeten diagnostischen Methode (u.a. Histologie, Ultraschall, Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Leberwerte). Williams et al. (103) führten in den USA bei 134 von 328 Patienten, im Alter zwischen 18 und 70 Jahren, bei denen die Sonographie Anzeichen für eine Steatosis ergeben hatte, eine Leberbiopsie durch. In dieser Studie wurde eine NAFLD-Prävalenz von 46% festgestellt. Außerdem variierte die Prävalenz der NAFLD in den ethnischen Gruppen: Spanier wiesen das höchste NAFLD-Risiko auf, gefolgt von anderen Europäern und Afroamerikanern. Für eine andere große Studie in Korea wurde bei 589 Lebendspendern eine Leberbiopsie durchgeführt. Hier zeigte sich eine NAFLD-Prävalenz von 51% . Alter, Adipositas und Hypertriglyceridämie waren die drei unabhängigen Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD (61). Browning et al.

(14) quantifizierten den hepatischen Triglyzeridgehalt in einer multiethnischen Studie in den USA mittels Magnetresonanztomographie bei 2.287 Patienten. Eine NAFLD konnte bei einem Drittel der Population festgestellt werden. Hierbei ergab sich wiederum eine Varianz der Prävalenz bezüglich der Ethnizität (45% bei Spaniern, 33% bei Europäern, 24% bei Afroamerikanern) und des Geschlechtes (42% bei Männern, 24% bei Frauen).

In einer Meta-Analyse von 86 Studien aus 22 Ländern aus dem Zeitraum von 1989 bis 2015 wurden die Prävalenz, die Inzidenz, die Progression und das Outcome von NAFLD und NASH abgeschätzt. Zur Bewertung der Prävalenz wurden nur die 45 Studien berücksichtigt, bei denen die Diagnose der NAFLD auf bildgebenden Verfahren basierte. Die NAFLD-Prävalenz weltweit wurde bei 25% geschätzt. Die mit 32% höchste NAFLD-Prävalenz konnte in mittleren Osten beobachtet werden, gefolgt von Südamerika mit 31%, Asien mit 27% und Nordamerika mit 24%. In den 11 Studien aus Europa lag die Prävalenz bei 24%, während das niedrigste Risiko, an einer NAFLD zu erkranken, in Afrika beobachtet wurde (14%). Aus der gleichen Meta-Analyse ergab sich eine Zunahme der NAFLD-Prävalenz in Abhängigkeit vom Alter, denn in der Gruppe von 30 - 39 Jahren lag sie bei 22% und in der von 70 - 79 Jahren bei 34% (109). Die Prävalenz bei stark adipösen Patienten, die sich einer bariatrischen Operation unterziehen, liegt bei über 90% (109).

3.4 Pathophysiologische Mechanismen

Die Ätiopathogenese der NAFLD/NASH ist multifaktoriell und lässt sich durch die traditionelle „two hit“ Hypothese erklären (11). Allerdings wird aufgrund neuer Erkenntnisse mittlerweile die „two hit“ Hypothese durch die „multiple hit“ Hypothese ersetzt.

Als „first hit“ der „two hit“-Theorie wird die Entwicklung einer Steatosis im Rahmen einer Adipositas, eines Diabetes mellitus Typ 2 und einer Hypertriglyzeridämie angesehen. Diese entsteht nicht allein durch die vermehrte Fettsäure-Synthese, drei Mechanismen spielen zusätzlich eine wichtige Rolle: Der erste Mechanismus ist ein erhöhter Fettsäure-Transport zur Leber mit vermehrter intrahepatischer Fettsäure-Aufnahme, die auch bei Prozessen entsteht, bei denen es zu einer Steigerung der Lipolyse im peripheren Fettgewebe kommt wie z. B. bei peripherer Insulin-Resistenz oder bei massivem Gewichtsverlust. Als zweiter Mechanismus gilt eine verminderte

intrahepatische β -Oxidation. Die periphere Insulin-Resistenz und die Hyperinsulinämie führen zu gesteigerter peripherer Lipolyse und dadurch zur Abnahme der β -Oxidation. Die hierdurch intrahepatisch akkumulierenden freien Fettsäuren werden zu Triglyzeriden synthetisiert und als VLDL in das Blut sezerniert bzw. in den Hepatozyten gespeichert. Es resultieren eine Hypertriglyzeridämie sowie eine Steatosis hepatis. Der dritte Mechanismus wird bei Mangelernährung beobachtet. Hierdurch kommt es bei einem Proteinmangel, der zu einer erniedrigten Very Low Density Lipoprotein (VLDL)-Synthese- und Exkretion führt. Die Triglyzeride werden nicht mehr aus den Hepatozyten heraustransportiert, sie bleiben in diesen gespeichert und führen zur Steatosis (11).

Beim „second hit“ führt die inkomplette Oxidation zu einem erhöhten Fettsäure-Angebot, was oxidativen Stress und gesteigerte Lipoapoptose der Hepatozyten zur Folge hat. Dies in Kombination mit einem Exzess von Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF, Leptin) und Adipokinen führt zu Entzündung und Fibrose bis hin zur Leberzirrhose (11, 88).

Der „multiple hit“-Theorie zufolge ist die Steatose und die Inflammation mehrerer schädlicher Mechanismen bedingt. Der erste „hit“ ist hier die Insulinresistenz, die die vermehrte Fettakkumulation der Leber auslöst. Diese Situation ist der Trigger für weitere schädliche Mechanismen (oxidativer Stress, Lipolyse, Apoptose, Adipokin-Expression), die zu hepatozellulärer Schädigung und zur Progression von NAFLD zur NASH und folglich zur Fibrose/Zirrhose führen (107).

3.5 Diagnostik der NAFLD

3.5.1 Leberbiopsie als „Goldstandard“

Als „Goldstandard“ zur Diagnose von Steatose und NASH, gilt die Leberbiopsie, bei der eine histologische Sicherung erfolgen kann. Zudem bietet die Histologie prognostisch Informationen bezüglich des Risikos zur Entwicklung einer Leberzirrhose. Allerdings ist die Leberbiopsie eine invasive Methode, die mit Risiken verbunden ist. Die wichtigsten Komplikationen einer Leberbiopsie sind Blutungen, Galleleck, Organverletzungen (z.B. von Nieren, Lunge, Gallenblase) oder Infektionen (96). Aufgrund des Komplikationsrisikos ist die Leberbiopsie nicht die geeignete Methode, wenn mehrere Verlaufskontrollen notwendig sind, und das

Komplikationsrisiko sowie die anstehenden Verlaufskontrollen sind die häufigsten Gründe, weswegen die Patienten auf die Durchführung einer Leberbiopsie verzichten und sie ablehnen. Außerdem wird bei einer Leberbiopsie nur der 1/50.000 Anteil des Leberparenchyms beurteilt, was nicht immer repräsentativ ist (95). Weitere Nachteile der Leberbiopsie zur Entdeckung einer NAFLD sind die Inter- und Intraobserver Variabilität. Aus ökonomischer Sicht ist die Leberbiopsie ebenfalls nicht die bevorzugte Methode zur Entdeckung einer Steatose (95), wenn man die notwendige (stationäre) Überwachung und die Kosten bedenkt. Aus diesen Gründen und unter Berücksichtigung der großen Zahl an Patienten, die potenziell an NAFLD leiden, kann die Leberbiopsie nicht als Screeningmethode verwendet werden, sondern nur als diagnostische Methode bei einem bestimmten Patientenkollektiv, besonders bei Patienten mit erhöhtem Risiko für Steatohepatitis oder eine fortgeschrittene Erkrankung (9, 21, 82).

3.5.2 Ultraschall

Eine weit verbreitete, nicht-invasive diagnostische Methode stellt die Ultraschall-Diagnostik dar. Neben ihrer nicht-invasiven Art liegen ihre Vorteile in der fehlenden Strahlenbelastung sowie der einfachen Anwendung und ihrer Verfügbarkeit in den meisten klinischen Einrichtungen. Zudem ist sie eine kostengünstige Untersuchung, die auch aus ökonomischer Sicht von Vorteil ist. Die Ultraschall-Untersuchung ist die am häufigsten verwendete Untersuchung für die Diagnostik bei Patienten mit erhöhten Leberwerten (76). Die Sensitivität und Spezifität der Ultraschall-Diagnostik für die mäßige bis schwere Leberverfettung (histologisch mehr als 33% Fetteilagerung der Hepatozyten) liegen bei 82% bis 100% (63). Bei einer Fetteinlagerung der Hepatozyten < 20% oder bei einem BMI > 40 kg/m² bietet die Ultraschall-Untersuchung keine zuverlässige Diagnostik mehr (36). Ein Nachteil der Ultraschall-Diagnostik ist ihre Abhängigkeit von der Person des Untersuchers, denn je nach dessen Erfahrung kann der sonographische Befund variieren. Ein unerheblicher Nachteil der Ultraschall-Diagnostik ist, dass sie routinemäßig keine quantitative Evaluation der Leberverfettung liefert.

3.5.3 Transiente Elastographie / Controlled Attenuation Parameter

Die Transiente Elastographie (TE) (Fibroscan, Echosens, Paris) ist eine weitere nicht-invasive Methode zur Evaluation der Steatose und Fibrose. Durch die Ultraschall-Technologie wird hier zuerst die Lebersteifigkeit (LSM) gemessen. Die Messung basiert auf der vibrationskontrollierten Elastographie (VCTE). Hiermit wird das Elastizitätsmodul der Leber als Maß für die Lebersteifigkeit gemessen und in kPa angegeben. Cassinotto et al. (18) zufolge ist diese bei der Mehrheit der untersuchten Patienten eine geeignete Quantifizierung der Fibrose. Die wichtigsten Vorteile dieser Methode sind ihre einfache Anwendbarkeit und die fehlende Strahlenbelastung.

Ein weiterer nicht-invasiver Parameter des Verfahrens zur Quantifizierung der Steatosis hepatis ist die Controlled Attenuation Parameter-Messung (CAP). CAP nutzt den Umstand, dass Fett die Ausbreitung des Ultraschallsignals abschwächt und misst die Ultraschalldämpfung bei 3,5 MHz dB.m⁻¹ (86). De Lédinghen et al. (28) haben für die Graduierung einer Fettleber mittels CAP-Messung folgende Einteilung festgelegt: für Steatosegrad S \geq 1 CAP \geq 215 dB/m, für Steatosegrad S \geq 2 CAP \geq 252 dB/m und für Steatosegrad \geq S3 CAP \geq 296 dB/m. Sasso et al. (86) untersuchten mittels CAP 115 Patienten mit chronischer Lebererkrankung verschiedener Ätiologie und stellten für die Erkennung der Steatose eine hohe Sensitivität der CAP-Messung fest, und zwar bereits bei einer Fetteinlagerung der Hepatozyten von $> 10\%$. Chon et al. (23) beschreiben eine hohe diagnostische Genauigkeit der CAP-Messung für die Diagnose der Lebersteatose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. In einer Studie mit 112 Patienten mit chronischer Lebererkrankung zeigte sich, dass CAP-Messung auch für die Entdeckung einer leichten Steatose sensitiv ist (28).

In einer Metaanalyse von 19 Studien von Karlas et al. (54) ließ sich eine Sensitivität von 70% für die Detektion der Steatose Grad I (5 oder 10 - 33% der Hepatozyten), 77% für die Detektion der Steatose Grad II (34 - 66% der Hepatozyten) und 88% für die Steatose Grad III ($> 66\%$ der Hepatozyten) nachweisen. Die Spezifität lag für jeden Steatose-Grad bei 80%.

3.6 Vitamin D-Metabolismus

Der Begriff Vitamin D umfasst eine Gruppe von Steroid-Verbindungen, zu der Vitamin D₂ und Vitamin D₃ gehören (93). Vitamin D ist ein fettlösliches Vitamin, das in Kombination mit dem Parathormon (PTH) für die Kalzium- und Phosphathomöostase, sowie für die Regulation des Knochenstoffwechsels zuständig ist. In den letzten Jahrzehnten wurde zudem eine breite Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) in zahlreichen Organen wie dem Immunsystem, dem endokrinen System, Muskeln, Haut, Gehirn und Leber nachgewiesen, die darauf hinweist, dass Vitamin D zusätzlich mehrere weitere Funktionen wie Immunmodulation, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und inflammatorische Reaktion erfülle (34, 58).

Vitamin D wird als Vitamin D₃ durch UV-vermittelte Reaktion primär in der Haut produziert, kann aber, meistens als Vitamin D₂, auch durch die Nahrung aufgenommen werden. Die wichtigsten diätetischen Vitamin D-Quellen sind fettiger Fisch, Eigelb und Pilze, allerdings ist die Vitamin D-Aufnahme durch die Ernährung nur gering.

In der Haut wird die 7-Dehydrocholesterol durch die UV-Strahlung in Prävitamin D₃ und dann in Vitamin D₃ konvertiert. In der Leber wird Vitamin D zu 25-Hydroxyvitamin D (Kalzidiol) metabolisiert. 25-Hydroxyvitamin D wird dann in die Niere transportiert und in die aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D (Kalzitriol) hydroxyliert. Die Kalzitriol-Produktion wird durch das PTH sowie durch die Kalzium- und Phosphat-Konzentrationen im Serum reguliert (32).

Der Vitamin D-Status wird durch die Messung der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration im Serum festgestellt. 25-Hydroxyvitamin D ist der zentrale Metabolit des Vitamins D und reflektiert die Vitamin D-Versorgung. In Studien ermittelt man einen Mangel, eine suffiziente Versorgung oder eine Intoxikation mit Vitamin D durch die Bestimmung des totalen 25-Hydroxyvitamin D (Summe von 25-Hydroxyvitamin D₂ + 25-Hydroxyvitamin D₃).

Obwohl 1,25-Dihydroxyvitamin D die biologisch aktive Form von Vitamin D ist, wird diese Form aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit (4-6 Stunden) nicht zur Bestimmung des Vitamin D-Status verwendet. Stattdessen wird wegen der längeren Halbwertszeit von 15-20 Tagen 25-Hydroxyvitamin D bevorzugt. Außerdem führt eine Reduktion der Vitamin D-Konzentration zu einem Anstieg des PTH und dies wirkt sich auf die

1,25-Dihydroxyvitamin D-Konzentration aus, weswegen dieser Biomarker nicht die Vitamin D-Versorgung widerspiegelt.

Es sind für 25-Hydroxyvitamin D keine spezifischen Grenzwerte für Patienten mit chronischen Lebererkrankungen definiert worden, und die Grenzwerte werden kontrovers diskutiert (93). Historisch wird ein Vitamin D-Mangel durch eine 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration von < 20 ng/ml (< 50 nmol/L) definiert, wovon auch das Institute of Medicine (IOM) ausgeht (93). Demgegenüber spricht die Endocrine Society (Maryland, USA) ab eine 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration von < 30 ng/ml (75 nmol/L) von einem Vitamin D-Mangel (93). In unserem Labor besteht eine normale Vitamin D-Konzentration bei einer 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration ≥ 30 ng/ml (75 nmol/L). 25-Hydroxyvitamin D-Werte zwischen $20 - 30$ ng/ml weisen auf unzureichende Vitamin D-Versorgung auf. Ein Vitamin D-Mangel liegt bei einem 25-Hydroxyvitamin D-Wert < 20 ng/ml und ein starker Vitamin D-Mangel bei Werten < 10 ng/ml vor.

3.7 Vitamin D Supplementation zur Prävention/Behandlung

Nachweise für die wichtige Rolle des Vitamins-D in verschiedenen Organsystemen werden immer häufiger erbracht. Zahlreiche Beobachtungsstudien - wenngleich nicht alle (13, 64) - stellen eine Assoziation zwischen Vitamin D-Mangel, Adipositas, NAFLD, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen (31, 69, 79) fest, und die Assoziation zwischen Vitamin D-Mangel und NAFLD wurde durch verschiedene Studien sowie durch zwei Metaanalysen bestätigt (35, 45, 55, 58, 97, 100). Die Vorteile einer Vitamin D-Supplementation zur Prävention/Behandlung der NAFLD sind Gegenstand aktueller Untersuchungen (45) und basieren auf dem Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) in der Leber sowie auf den vielfältigen Funktionen des Vitamins D, bei Immunregulation und chemischer Entzündung (8, 41, 112).

Niedrige Vitamin D-Konzentrationen könnten durch eine vermehrte Zirkulation von freien Fettsäuren (FFA) die Fettakkumulation in der Leber begünstigen (8, 99). Für eine Korrelation zwischen niedrigen 25-Hydroxyvitamin D-Konzentrationen und erhöhtem Körperfett finden sich in der Literatur ebenfalls Belege (27, 47). Dies könnte, zumindest teilweise, dadurch bedingt sein, dass das Fettgewebe die Bioverfügbarkeit des Vitamins D reduziert (105).

Nakano et al. (73) untersuchten den Einfluss von Sonnenlicht-Exposition auf Ratten mit NAFLD und Vitamin D-Mangel. Eine Phototherapie von 12 Stunden/Tag führte zu einer Erhöhung der Vitamin D-Konzentration und einer Reduktion der hepatischen Inflammation (73). Die Wirkung der Vitamin D-Gabe bei Adipositas, als wichtigstem Risikofaktor für die Entwicklung der NAFLD, hat Wortsman et al. (105) untersucht. Hier wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Vitamin D-Konzentration nach Sonnenexposition bei adipösen Patienten um 57% geringer war als bei nicht adipösen Patienten.

Mehrere Studien sind allerdings noch notwendig, um die biologische Aktivität des Vitamins D genauer zu klären und die klinischen Vorteile einer Supplementation belegen zu können.

3.8 Ziel und Fragestellungen

Ziel dieser Studie ist der Nachweis einer quantitativen Verbesserung bzw. Reduktion der mittels CAP gemessenen Steatose durch eine Vitamin D-Supplementation bei Patienten mit Steatosis hepatis und Vitamin D-Mangel. Anhand unserer Studie sollten die folgenden Hypothesen überprüft werden:

- a. Eine sechsmonatige Vitamin D-Supplementation reduziert die Lebersteatose bei Patienten mit Steatosis hepatis und Vitamin D-Mangel.
- b. Eine sechsmonatige Vitamin D-Supplementation verbessert bei Patienten mit Steatosis hepatis und Vitamin D-Mangel nicht nur die Lebersteatose, sondern auch die Leberfunktionsparameter.
- c. Die Vitamin D-Supplementation reduziert die Lebersteatose bereits nach 4 Wochen bei Patienten mit Steatosis hepatis und Vitamin D-Mangel.

4 PATIENTEN UND METHODEN

4.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive, offene Studie, in die Patienten mit Steatose (CAP-Messung ≥ 280 dB/m) (108) und Vitamin D-Mangel (Serum 25-Hydroxyvitamin D < 20 ng/ml) (51) eingeschlossen wurden. Die Studien-Patienten wurden im Zeitraum von Januar 2014 bis Mai 2015 in der Ambulanz der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg untersucht.

Diese Studie wurde nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Protokoll basierte auf einer bereits publizierten Studie (92) und die Veränderungen wurden durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes geprüft (Nr.: 57/11). Eine schriftliche Einverständniserklärung seitens der Patienten war Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie.

4.2 Studienpopulation

Es wurden die elektronischen Daten von Patienten, die die Ambulanz unserer Klinik aufgesucht hatten, ausgewertet und davon diejenigen telefonisch kontaktiert, aus deren ärztlichen Dokumenten sich weder eine Alkoholanamnese noch eine Leberzirrhose ergab und die einen CAP ≥ 280 dB/m und eine Vitamin D-Konzentration < 20 ng/dl aufwiesen.

Insgesamt wurden 49 Patienten untersucht. Von diesen wurden 40, 21 Männer und 19 Frauen, im Alter > 18 Jahre und mit Steatose sowie Vitamin D-Mangel in die Studie eingeschlossen. Das Patientenkollektiv setzte sich nach folgenden Ein- und Ausschlusskriterien zusammen:

4.2.1 Einschlusskriterien

- Fähigkeit, eine schriftliche Einverständniserklärung zu verstehen und zu unterschreiben
- Frauen und Männer > 18 Jahre
- Patienten mit Leberverfettung (> 280 dB/m durch CAP-Messung)
- Patienten mit Vitamin D-Mangel (25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentrationen < 20 ng/ml)

4.2.2 Ausschlusskriterien

- Fehlen einer Einwilligung zur Studie oder zur Entnahme einer Gewebeprobe
- Hyperkalzämie oder Hyperkalziurie
- Pseudohypoparathyreoidismus
- Tendenz zu Nierensteinen (Kalzium-Oxalat-Steine)
- Allergie oder Unverträglichkeit auf folgende Bestandteile: Erdnüsse, Soja und Gelatine
- Schwangerschaft
- Sarkoidose
- Chronische Nierenerkrankung (KDOQI-Stadium IV oder V)
- Leberzirrhose (Fibroscan, Lebersteifigkeit > 13,0 kPa)
- Alkoholkonsum*

*(wöchentliche Alkoholeinnahme von > 21 Getränken bei Männern, d.h. ca. 30 g Alkohol/Tag und > 14 Getränken, d.h. ca. 20 g Alkohol/Tag bei Frauen) (21, 82).

4.3 Intervention

Bei den 40 Patienten wurde, nach ausführlicher Aufklärung, für die ersten 7 Tage eine Therapie mit Colecalciferol/Vitamin D₃ (Dekristol®, Jenapharm, Jena, Deutschland) 20.000 IE/Tag eingeleitet, gefolgt von 20.000 IE/Woche für insgesamt 6 Monate. Ein Follow-up erfolgte nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten.

4.4 Studienablauf

4.4.1 Baseline

Zur Baseline wurden die Patienten anhand der Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt. Anschließend wurden sie über unsere Hypothese, den Studienablauf und die möglichen Nebenwirkungen einer Dekristol-Therapie sowohl mündlich als auch schriftlich, aufgeklärt. Die an der Studie interessierten Patienten haben eine Einverständniserklärung unterschrieben; den Patienten wurde eine vom Prüfarzt unterschriebene Kopie der Einverständniserklärung ausgehändigt.

Zur Beurteilung der Steatose erfolgten eine CAP-Messung sowie hernach eine Blutentnahme (s.u.) mit Bestimmung von: Serum 25-Hydroxyvitamin D, Parathormon (PTH), Kalzium, Phosphat, Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), alkalische Phosphatase (AP), γ -Glutamyltransferase (γ -GT), Bilirubin, Albumin, Kreatinin und Harnstoff. Kalzium und Phosphat wurden außerdem im Urin bestimmt.

Zur Berechnung des body mass index (BMI) wurden die Größe und das Gewicht gemessen und zur Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde eine Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) durchgeführt.

Anschließend wurden die Probanden zum Ausfüllen von zwei Fragebögen aufgefordert, einem Audit/CAGE-Fragebogen (Appendix 11.1) zur Beurteilung des Alkoholkonsums und einen für Baselinecharakteristika der Patienten (aktueller Gesundheitsstatus, soziodemographische Informationen, Anamnese, Medikamentenanamnese, differenziert nach verschreibungs- und nicht verschreibungspflichtigen Medikamenten, Sonnenlichtexposition und Jahreszeit zum Zeitpunkt der Datenerhebung). Durch einige Fragen, basierend auf der „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition“ (EPIC), wurden Informationen bezüglich der körperlichen Aktivität der Patienten erfasst, woraufhin die Probanden in vier Gruppen eingeteilt werden konnten (inaktiv, mäßig inaktiv, mäßig aktiv und aktiv) (102).

Die Probanden wurden außerdem für die Dauer der Studie auf die Einnahme anderer Vitamine verzichtet. Die Compliance sollte bei jeder Verlaufskontrolle überprüft werden. Deshalb wurden die Probanden gebeten, ihre Vitamin D Tabletten zum nächsten Termin mitzubringen.

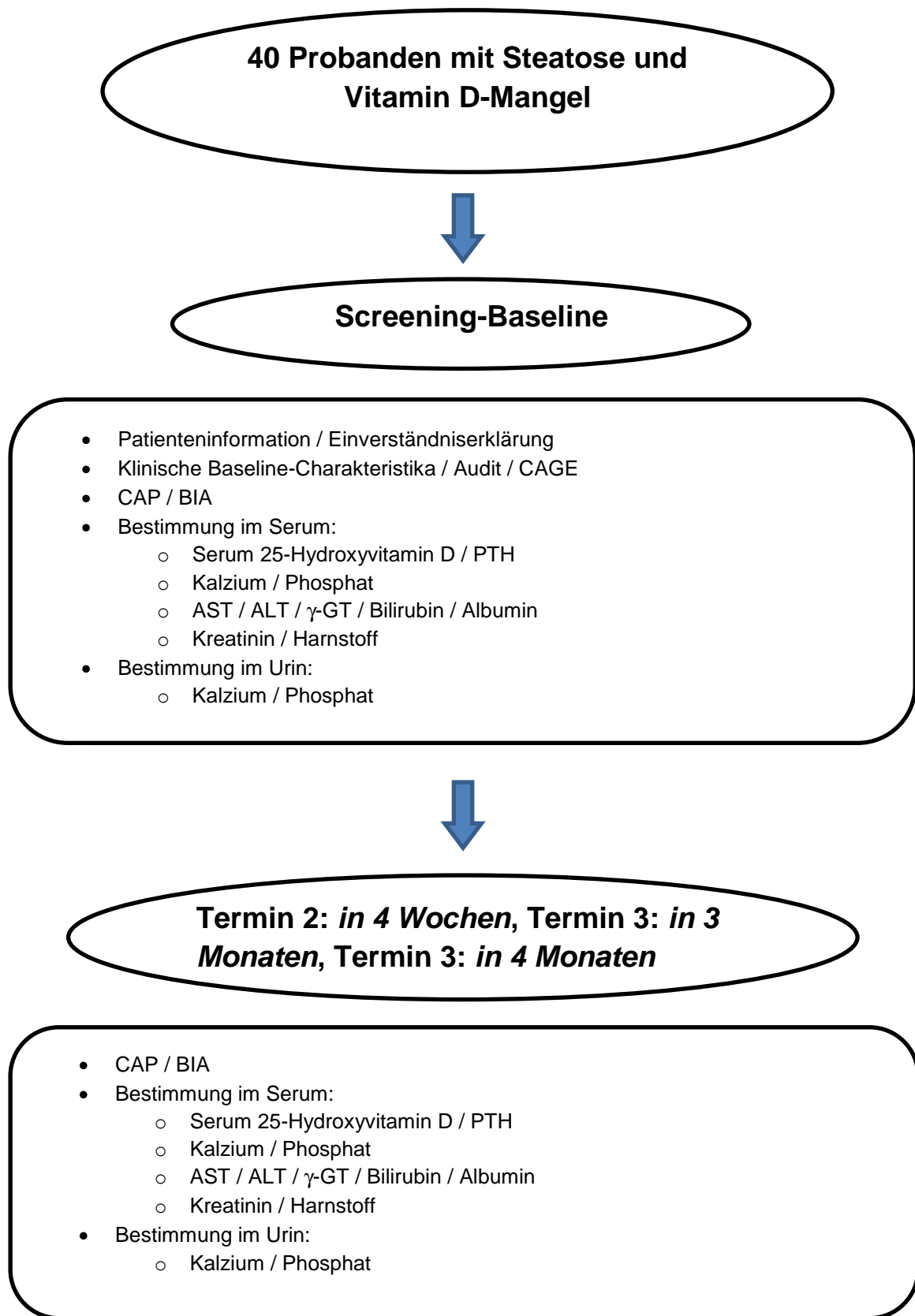
4.4.2 Verlaufskontrollen

Bei den folgenden Verlaufskontrolle-Terminen wurden die Probanden, nach Prüfung der Tablettenzahl, um das Ausfüllen eines Fragebogens gebeten (Gesundheitsstatus, Medikamente, körperliche Aktivität, Sonnenlichtexposition). Es wurden Körpergröße und Gewicht dokumentiert.

Anschließend erfolgten CAP und BIA-Messung sowie eine Blutentnahme zur Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D, PTH, Kalzium, Phosphat, AST, ALT, γ -GT,

Bilirubin, Albumin, Kreatinin und Harnstoff. Außerdem wurde eine Urinuntersuchung auf Kalzium und Phosphat durchgeführt.

Abbildung 1: Studienablauf-Diagramm



4.5 Beurteilung des Vitamin D-Status

Für die Beurteilung des Vitamin D-Status wurde aufgrund seiner längeren Halbwertszeit der 25-Hydroxyvitamin D-Wert und nicht die biologisch aktivere Form 1,25-Dihydroxyvitamin D bestimmt. Der 25-Hydroxyvitamin D-Wert ist weniger starken Schwankungen unterworfen und spiegelt die Vitamin D-Versorgungssituation besser wieder. Eine normale Vitamin D-Konzentration liegt bei einer 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration ≥ 30 ng/ml (75 nmol/L) vor. 25-Hydroxyvitamin D-Werte zwischen 20 - 30 ng/ml weisen auf unzureichende Vitamin D-Versorgung auf. Ein Vitamin D-Mangel liegt bei einem 25-Hydroxyvitamin D-Wert < 20 ng/ml und ein starker Vitamin D-Mangel bei Werten < 10 ng/ml vor.

4.6 Begleitmedikation

Die gesamte Medikation der Probanden wurde bei jedem Termin dokumentiert, um Veränderungen der Medikation bzw. Dosierung oder eventuelle Wechselwirkungen kontrollieren zu können.

4.7 Beurteilung der Compliance

Während der Studie wurde die Compliance durch ‚intervall pill counts‘ und die Vitamin D-Konzentration kontrolliert. Hierbei haben wir bei jedem Termin die Zahl der Restkapseln im Medikamentenbehälter gezählt. Damit die Probanden nicht das Gefühl haben, unter enger Beobachtung zu stehen, wurde nach Empfehlung von Brunner et al. (15) das Zählen nicht vor den Patienten durchgeführt. Trotz des Risikos einer Überschätzung der Compliance ist diese Methode einfach, schnell und kostengünstig. Wichtig ist, dass für jeden einzelnen Patienten die Ergebnisse mit der Vitamin D-Konzentration als biochemischem Marker abgeglichen werden.

Viele Studien definieren Compliance als die Einnahme von $> 80\%$ der empfohlenen Medikation (15, 60, 111). Wenn die Probanden trotz Bemühungen des Studienteams Compliance unter 80% zeigen (z.B. innerhalb von 3 Monaten Einnahme von $> 3-4$ Kapseln weniger), sollte der Studienleiter einen eventuellen Ausschluss des Probanden aus der Studie entscheiden.

4.8 Beurteilung der Steatosis hepatis und der Fibrose

Die Steatosis hepatis wurde durch die neue nicht-invasive Methode der vibrationskontrollierten transienten Elastographie (Fibroscan, Echosens SA, Paris) einschließlich CAP-Messung (Controlled Attenuation Parameter) untersucht. Bei dieser Methode macht man sich die Schallabschwächung des Ultraschallsignals durch das Fett zunutze und quantifiziert mit der Sonde M die Dämpfung des Ultraschallsignals (4).

Die CAP-Werte werden in Dezibel pro Meter (dB/m) gemessen und variieren von 100-400 dB/m. Je höher die CAP-Werte ausfallen, desto stärker ist die Steatose. In unserer Studie wurden als „Cut off“- Wert 280 dB/m definiert, was für eine signifikante Steatose spricht (4, 87, 108).

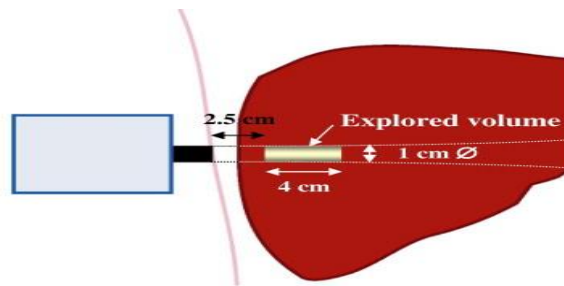
Die transiente Elastographie umfasst Messungen der Lebersteifigkeit (LSM), die in kilo Pascal (kPa) gemessen werden, wobei die Werte von 2,5 – 75,0 kPa variieren. Patienten mit Werten $> 13,0$ kPa zur Baseline wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Während der Patient auf dem Rücken liegt und seinen rechten Arm hinter dem Kopf ausgestreckt hält, wird die Sonde intracostal an der Medioaxillarlinie und ventral des Processus Xyphoideus an die Haut angelegt. Mindestens 10 gültige Messungen sind notwendig, um einen mittleren CAP- und LSM-Wert zu erhalten, der hinsichtlich Steatose bzw. Lebersteifigkeit aussagekräftig ist (4, 19). Gleichzeitig werden auf dem Bildschirm weitere Werte [Interquartile Range (IQR), IQR/Median, Erfolgsquote] angezeigt, die für die Qualität der Messung wichtig sind.

Die meisten CAP-Messungen wurden von einer erfahrenen Untersucherin durchgeführt, so dass Fehler durch unterschiedliche Untersucher im Sinne einer Interobserver-Reliabilität ausgeschlossen werden konnten. In einzelnen Fällen, wo aber nicht möglich war, wurde die CAP-Messung durch erfahrenes assistenz-Personal vorgenommen.

Eine schematische Darstellung des Messvorgangs wird in Abbildung 2 präsentiert.

Abbildung 2: Schematische Abbildung der CAP- und LSM-Messung



Position der Fibroscan-Sonde zur CAP- und LSM-Messung und untersuchte Lebervolumina.

Abbildung aus L. Castera et al. (19) / Journal of Hepatology 48 (2008) 835-847.

4.9 Beurteilung des Alkoholkonsums

Der Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) (Appendix 11.1) wurde durch die World Health Organisation (WHO) entwickelt, um Alkoholabhängigkeit oder gefährlichen oder schädlichen Alkoholkonsum bei Erwachsenen festzustellen (6). Hatton et al. (48) haben den AUDIT verwendet, um speziell Alkoholmissbrauch oder Alkoholabhängigkeit zu untersuchen. In dieser Studie mit 234 Probanden wurde festgestellt, dass 106 Patienten an einer alkoholischen Lebererkrankung (ALD: Alcoholic Liver Disease) litten. Der AUDIT ist 10-teiliger Fragebogen. Er umfasst drei Fragen, die die Menge und die Häufigkeit der Alkoholeinnahme beurteilen, drei Fragen, die eine Alkoholabhängigkeit betreffen und vier Fragen, mit denen Problemen nachgegangen wird, die als Folge des Alkoholkonsums auftreten können. Der Fragebogen ist schnell und einfach zu beantworten und kann selbst in einer Sitzung vollständig ausgefüllt werden (ca. 2 Minuten).

Der Fragebogen ist in verschiedenen Sprachen verfügbar. Seine Zuverlässigkeit und Validität wurden in einer deutschen Bevölkerungs-Stichprobe ermittelt, wobei die Sensitivität und Spezifität für Alkoholabhängigkeit bei 97% bzw. 92% lagen (33).

Im AUDIT-Fragebogen ist auf jede Frage als Antwort eine Punktzahl (0, 1, 2, 3 oder 4) zu vergeben. Aus der Gesamtpunktzahl für die 10 Fragen ergibt sich das Alkoholprofil des Probanden. So besteht bei einer Gesamtpunktzahl > 16 ein großes Alkoholproblem, bei Werten von 8 - 15 ein mäßiges Alkoholproblem und bei einer

Gesamtpunktzahl < 8 kein Alkoholproblem. In unsere Studie wurden nur Patienten mit Scores < 8 eingeschlossen.

Der CAGE-Fragebogen (Appendix 11.1) ist einer der am häufigsten verwendeten Fragebögen zur Aufdeckung von Alkoholabusus oder -abhängigkeit mit einer von Sensitivität von 71% und einer Spezifität von 92% (29). Es handelt sich um einen kleinen und einfachen Fragebogen, der aus vier Fragen besteht (37). In unserer Studie wurde als Alkoholabusus der wöchentliche Genuss für Männer von > 21 Getränken Alkohol, was ca. 30 g Alkohol/Tag entspricht, und für Frauen der von > 14 Getränken, was ca. 20 g Alkohol/Tag entspricht, definiert (21, 82). Für diese Studie wurden bei jedem Termin beide Fragebögen verwendet. Die Informationen wurden im Arztgespräch erhoben.

4.10 Beurteilung der Körperzusammensetzung

Zur Baseline wurde der BMI bestimmt, und das Gewicht wurde bei jedem Termin kontrolliert. Der BMI ist die Berechnungsgrundlage für die Gewichtsklassifikation und wird zur Beurteilung von Unter- oder Übergewicht verwendet. Der BMI berechnet sich nach der Formel: $BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / [\text{Körpergröße (m)}]^2$. Laut WHO (104) besteht ein normales Gewicht bei BMI-Werten von 18,5 - 24,9 kg/m². Als übergewichtig gelten Patienten mit einem BMI zwischen 25,0 und 30 kg/m² und als adipös werden die Patienten mit einem BMI ≥ 30 kg/m² angesehen.

Die Körperzusammensetzung wurde mittels BIA bestimmt, eine elektrische Widerstandsmessung des Körpers (TANITA, Sindelfingen). Durch Elektroden an Händen und Füßen wird bei der BIA-Messung ein elektrisches Wechselstromfeld erzeugt. Durch die BIA-Messung kann das körperliche Fett von Wasser unterschieden werden, da beide verschiedene elektrische Widerstände haben. Nach Angabe von Alter, Geschlecht und Größe des Patienten und Gewichtsbestimmung wurden durch die BIA-Messung die Fettmasse, die Muskelmasse sowie das Körperwasser absolut und relativ berechnet. Außerdem wurde das viszerale Fett berechnet.

BIA ist eine einfache nicht-invasive Methode, die auch für Patienten mit Lebererkrankungen validiert wurde (59). In den European Society for Enteral and Parenteral Nutrition (ESPEN)-Leitlinien (59) wird für Patienten mit stabilem Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt die Verwendung von BIA empfohlen.

4.11 Blutentnahme und Laborparameter

Von jedem Patienten wurde zu den einzelnen Terminen Blut zur Bestimmung der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration abgenommen. Die Analyse wurde mittels Chemilumineszenz-Immunoassay LAISION 25-Hydroxyvitamin D TOTAL-Probe (DiaSorin, Minnesota, USA) durchgeführt. Zudem wurde Blut zur Bestimmung der Aktivität von Aspartat-Aminotransferase (AST)/Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Alanin-Aminotransferase (ALT)/Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), alkalischer Phosphatase (AP), γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT), Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Kalzium, Phosphat und Parathormon (PTH) abgenommen. Zusätzlich erfolgte bei jedem Termin eine Urin-Untersuchung zur Bestimmung von Kalzium und Phosphat. Bei auffälligen Werten im Urin wurden die Probanden telefonisch informiert und zwecks Kontrolle erneut zur Durchführung einer 24-h-Sammelurin-Untersuchung einbestellt.

4.12 Primäre und sekundäre Endpunkte

Der primäre Endpunkt unserer Studie war die Bewertung quantitativer, absoluter und relativer (Prozentsatz) Veränderungen der unter Vitamin D-Supplementation durch CAP-Messung bestimmten Steatose.

Der sekundäre Endpunkt bestand, neben der Beurteilung von Veränderungen der Steatose zu den Verlaufskontroll-Terminen (4 Wochen, 3 Monate und 6 Monate) in der Bewertung der Leberfunktionsparameter unter Vitamin D-Supplementation.

4.13 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden, abhängig von der Daten-Verteilung, als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Medianwert \pm Spannweite dargestellt. Für normalverteilte Daten wurde zunächst parametrische Statistik angewandt; nicht parametrische Statistik wurde hingegen für Daten herangezogen, die nicht normalverteilt waren. Zur Bewertung der Unterschiede zwischen kontinuierlichen, ungepaarten Variablen wurde für die parametrische Daten t -Tests und für die nicht-parametrischen Daten Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Die Unterschiede zwischen kategorialen Variablen wurden mittels χ^2 -Test bewertet.

Der Vergleich von verbundenen Proben (prä- und post-interventionell) wurde mittels Per-Protokoll (PP)-Analyse durchgeführt. Die Analyse wurde unter Anwendung des Intention-to-treat (ITT)-Prinzips wiederholt. Zur Analyse der bei wiederholten Messungen auftretenden Unterschiede und zur Evaluation von im Laufe der Zeit sich einstellenden Veränderungen (ANOVA) wurden die Bonferroni-Korrektur oder der nicht-parametrische Friedman-Test verwendet. Wenn signifikante Veränderungen auftraten, haben wir post-hoc paired *t*-Tests oder Wilcoxon-signed-rank-Tests herangezogen, um die absoluten und relativen Veränderungen zwischen den beiden Zeitpunkten zu vergleichen.

Zusätzlich wurde der Einfluss der saisonalen Veränderungen auf die Vitamin D-Konzentration untersucht. Dies erfolgte durch den Vergleich der Proben, die im Sommer und Herbst abgenommen wurden und mit höherer Konzentration assoziiert waren, und der Proben, die im Winter und Frühling abgenommen wurden. Hier wurden anhand des Baseline-Werts verglichen (Mangel vs. starker Mangel).

Statistische Signifikanz wurde ab einem zweiseitigen *p*-Wert < 0.05 angenommen.

Alle statistischen Analysen der Studie wurden mit SPSS (IBM München) oder GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., Ost California) durchgeführt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Patientencharakteristika

Insgesamt 40 Patienten, davon 19 (47,5%) Frauen und 21 (52,5%) Männer, nahmen an der Studie teil. Tabelle 1 fasst die Charakteristika der Patienten zusammen. Alle Patienten haben sich zur ersten Verlaufskontrolle nach 4 Wochen vorgestellt. Allerdings sind sieben Patienten nach drei Monaten nicht zur zweiten und drei Patienten nach 6 Monaten nicht zur dritten Verlaufskontrolle erschienen.

Das mittlere Alter lag bei $54,9 \pm 12,1$ Jahren und der mittlere BMI-Wert betrug $29,5 \pm 3,0$ kg/m². Bei 39,5% der Probanden lag der Viszerale-Fett-Index über dem Normbereich (> 12) 20% der Patienten waren nach der EPIC-Einteilung hinsichtlich der körperlichen Aktivität inaktiv (7, 102). Die meisten Patienten waren stark (42,5%) oder mäßig inaktiv (37,5%). Insgesamt acht Patienten litten an einer chronischen Hepatitis B- (n = 7) oder C-Virus-Infektion (n = 1).

Der mittlere CAP-Wert am Baseline-Termin lag bei 330 ± 32 dB/m, und die mittlere 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration im Serum betrug $11,8 \pm 4,8$ ng/ml. Im Sommer oder Herbst wurden 40% der Patienten untersucht. Bei ihnen lag die mittlere Vitamin D-Konzentration bei $13,9 \pm 5,3$ ng/ml und damit signifikant höher ($P = 0,022$) als bei den übrigen 60% der Patienten, die im Winter oder Frühling untersucht wurden und eine mittlere Serum-Vitamin D-Konzentration von $10,4 \pm 3,9$ ng/ml aufwiesen. Patienten mit starkem Vitamin D-Mangel (< 10 ng/ml) zeigten einen nicht signifikant höheren CAP-Wert im Vergleich zu den Patienten mit mäßigem Vitamin D-Mangel (339 ± 32 vs. 323 ± 30 dB/m). Bei insgesamt 7,5%, 22,5%, 42,5% und 51,3% der Patienten waren die AP-, AST-, γ -GT- bzw. ALT-Aktivitäten erhöht. Außerdem lag bei den Patienten mit starkem Vitamin D-Mangel der Parathormon (PTH)-Spiegel signifikant ($P = 0,001$) höher als bei denen mit mäßigem Vitamin D-Mangel (51 vs. 33 pg/ml). Zur Baseline konnte eine inverse Korrelation zwischen Serum-Vitamin D- und PTH-Konzentrationen festgestellt werden ($R^2 = 0,196$, $P = 0,004$) (Abbildung 3).

Die mittlere Compliance bezüglich der Einnahme der Vitamin D-Supplementation lag bei 99,6% (75 - 100%). Die richtige Befolgung der Einnahme konnte bei den Verlaufskontrollen durch die Vitamin D-Konzentration und durch das Zählen der restlichen Kapseln überprüft werden. Es sind keine Nebenwirkungen aufgetreten. Die Daten aller Patienten wurden bei den Verlaufskontrollen analysiert. Sechs Fibroscan-

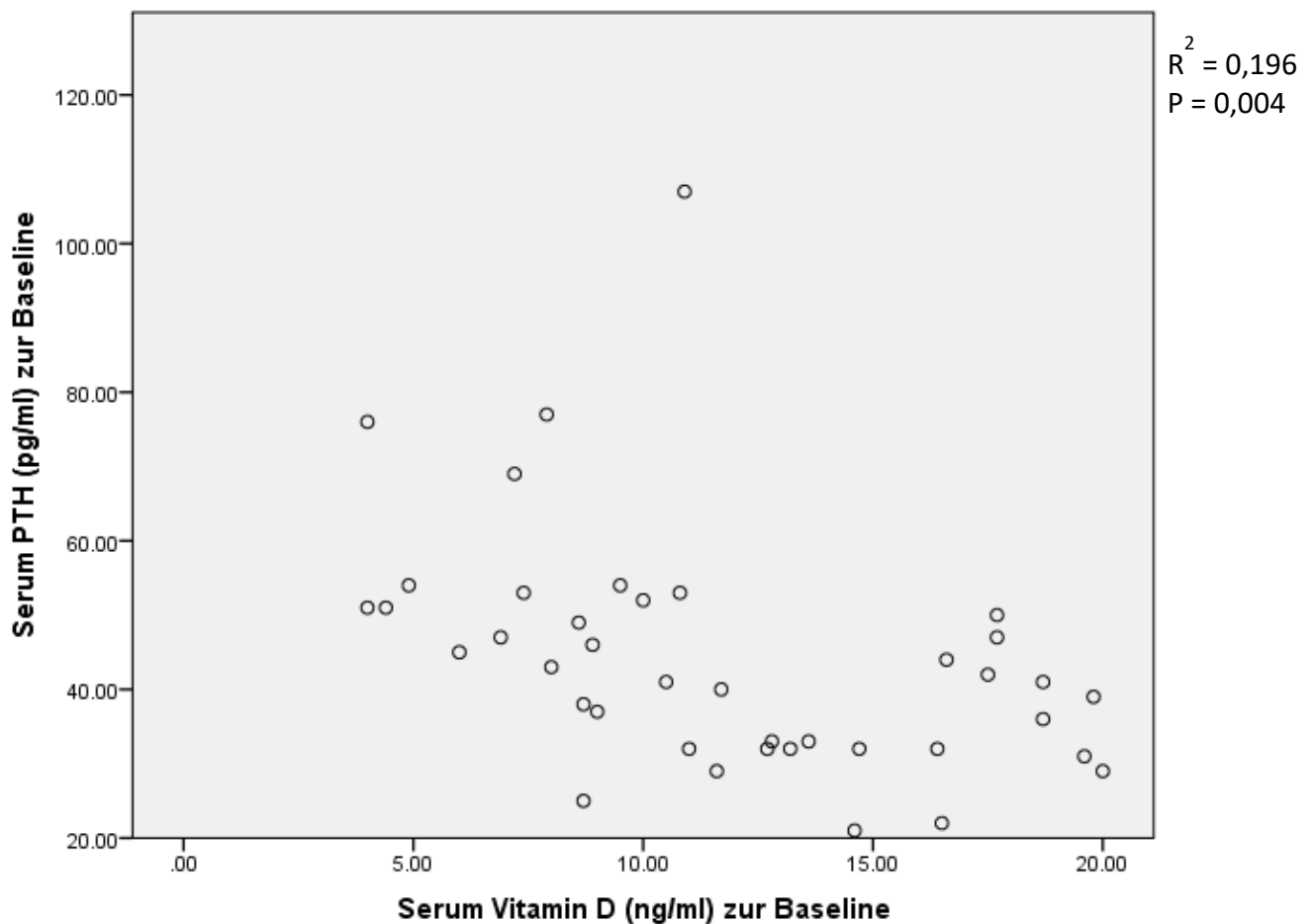
Werte verschiedener Patienten (zwei zur Baseline, drei bei der ersten Verlaufskontrolle, d.h. nach 4 Wochen, und einer bei der letzten Verlaufskontrolle, nach 6 Monaten) lagen außerhalb des vorgegebenen Schwellenwerts ($\text{LSM} > 13 \text{ kPa}$), so dass sie von der weiteren Fibroscan-Analyse ausgeschlossen wurden.

Tabelle 1: Patientencharakteristika zur Baseline und bei den Verlaufskontrollen

	Baseline (n = 40)	4 Wochen (n = 40)	3 Monate (n = 33)	6 Monate (n = 32)
Transiente Elastographie				
CAP (dB/m)	329,8 ± 31,7*	310,8 ± 39,8	307,1 ± 48,4	306,6 ± 40,5
LSM (kPa) Median (Spannweite)	6,9 (4,3 - 12,8)	6,7 (4,0 – 18,6)	6,4 (4,4 – 14,6)	7,0 (3,6 – 12,6)
Körperzusammensetzung				
BMI (kg/m²)	29,5 ± 3,0	29,1 ± 2,8	29,0 ± 2,9	28,9 ± 3,1
Übergewicht 25 ≤ BMI < 30	22 (55%)	23 (59%)	22 (67%)	18 (62%)
Adipös BMI ≥ 30	18 (45%)	16 (41%)	11 (33%)	9 (31%)
Fettfreie Masse (%)	67,9 ± 8,0	68,0 ± 7,9	66,1 ± 13,7	69,7 ± 9,3
Fettmasse (%)	32,3 ± 8,2	31,7 ± 7,8	32,6 ± 11,8	30,1 ± 9,0
Viszeraler Fett-Index (< 12)	23 (60,5%)	23 (60,5%)	24 (75%)	23 (74,2%)
Biochemische Marker				
25-Hydroxyvitamin D (ng/ml)	11,8 ± 4,8**	34,6 ± 12,9	36,3 ± 10,2	34,8 ± 9,8
Kalzium (mmol/l), Median (Spannweite)	2,4 (2,2 – 2,6)	2,4 (2,2 – 2,6)	2,4 (2,2 – 2,6)	2,4 (2,2 - 2,5)
Phosphat (mg/dl)	3,1 ± 0,5	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,6
PTH (pg/ml), Median (Spannweite)	41,5 (21,0 – 107,0)**	34,5 (21,0 – 95,0)	34,0 (9,0 – 67,0)	30,5 (16,0 – 52,0)
ALT (U/l), Median (Spannweite)	45 (13 – 131)	41 (15 – 89)	36 (12 – 96)	39 (11 – 133)
AST (U/l), Median (Spannweite)	34 (18 – 60)	31 (18 – 70)	30 (16 – 70)	32 (15 – 94)
γ-GT (U/l), Median (Spannweite)	50 (21 -292)	44 (18 – 183)	41 (18 -225)	41 (17 – 151)
AP (U/l)	75,2 ± 21,9	74,8 ± 19,8	72,7 ± 20,4	70,0 ± 17,6
Bilirubin (mg/dl), Median (Spannweite)	0,5 (0,1 – 1,2)	0,4 (0,2 – 2,4)	0,5 (0,2 – 1,7)	0,5 (0,2 – 1,6)
Albumin (g/l)	45,9 ± 2,4	45,5 ± 2,8	46,6 ± 2,3	46,3 ± 2,4
Kreatinin (mg/dl), Median (Spannweite)	0,88 (0,06 – 1,12)	0,88 (0,60 – 1,16)	0,89 (0,58 – 1,19)	0,89 (0,60 – 1,20)
Harnstoff (mg/dl)	28,4 ± 7,1	30,3 ± 8,6	30,5 ± 8,0	31,2 ± 5,5

Signifikante Veränderungen (ANOVA) wurden mit * (P < 0,05) und ** (P > 0,001) gekennzeichnet. (AP: Alkalische Phosphatase, BMI: body mass index, CAP: Controlled Attenuation Parameter, γ-GT: gamma-Glutamyltransferase, ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, LSM: Liver Stiffness Measurement, PTH: Parathormon).

Abbildung 3: Korrelation des Serum-PTH-Wertes mit der basalen Serum-Vitamin D-Konzentration



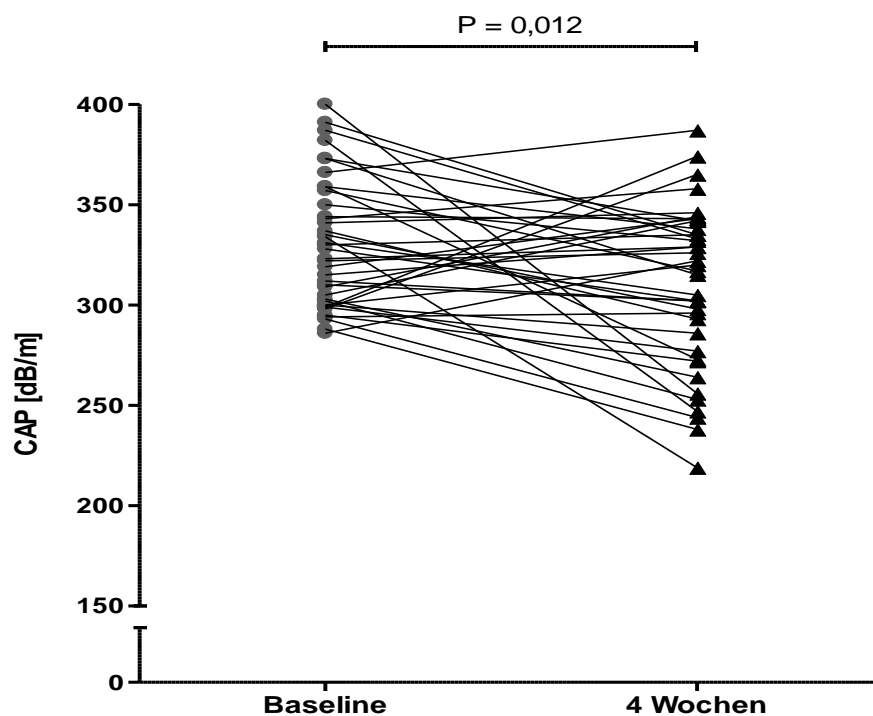
Inverse Korrelation zwischen Serum-PTH und Vitamin D-Konzentration am Baseline-Termin (PTH: Parathormon).

5.2 Steatosis hepatis

Eine signifikante Reduktion der CAP-Werte wurde schon nach vierwöchiger Vitamin D-Supplementation festgestellt (Abbildung 4), aber auch bei jeder weiteren Verlaufskontrolle (nach 3 Monaten und nach 6 Monaten). Die absolute mittlere Reduktion der CAP-Werte lag bei 23 dB/m, wobei der CAP-Wert von 330 ± 32 auf 307 ± 41 dB/m abnahm ($P = 0,007$) (Abbildung 5). Die CAP-Reduktion betrug innerhalb von 4 Wochen $-5,3 \pm 13,8 \%$ ($P = 0,012$); die CAP-Werte nahmen von 330 ± 32 auf 311 ± 40 dB/m ab. Innerhalb von 3 Monaten wurde eine Reduktion von 330 ± 32 auf 307 ± 48 dB/m um $-6,0 \pm 14,6\%$ ($P = 0,024$) und innerhalb von 6 Monaten

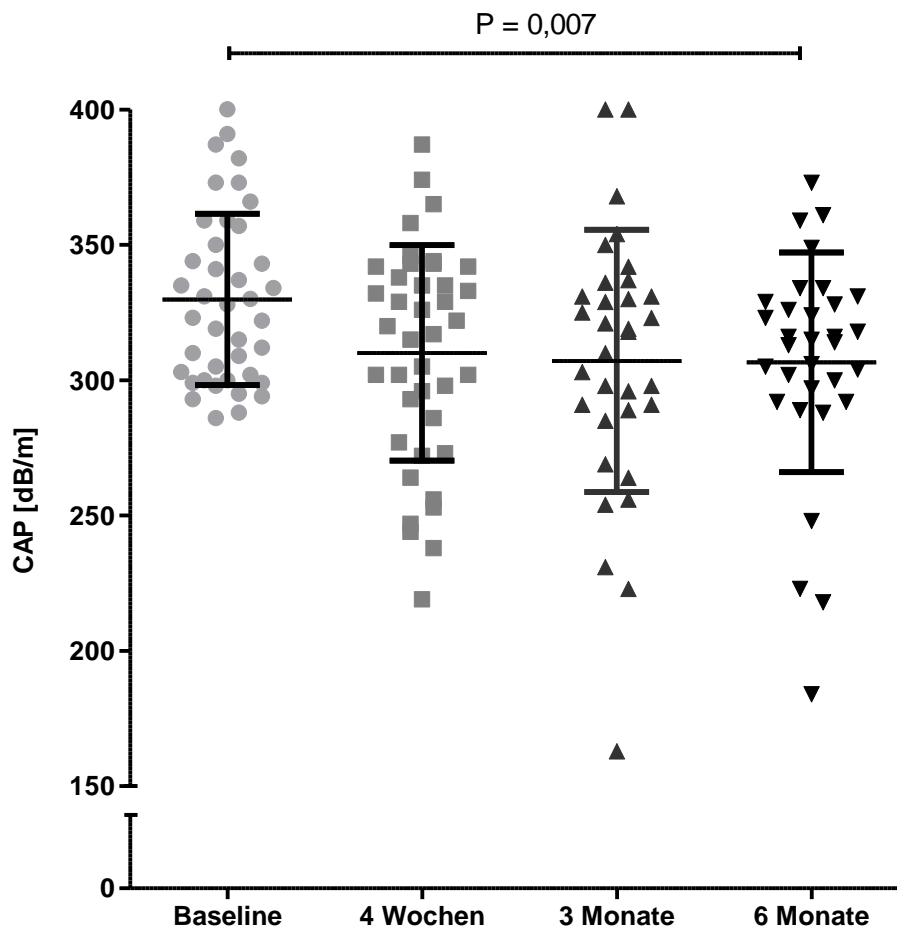
um $-6,4 \pm 13,0\%$ ($P = 0,008$) von 330 ± 32 auf 307 ± 41 dB/m im Vergleich zum Baseline-Termin dokumentiert. Zwischen den Verlaufskontrollen konnte allerdings keine weitere signifikante Verbesserung beobachtet werden. In Abbildung 4 werden von jedem einzelnen Patienten die individuellen Werte präsentiert.

Abbildung 4: Individuelle CAP-Werte zur Baseline und nach 4 Wochen



Individuelle CAP-Werte zur Baseline und bei der ersten Verlaufskontrolle nach 4 Wochen. Es konnte eine signifikante CAP-Reduktion bereits nach 4 Wochen Vitamin D-Supplementation beobachtet werden.

Abbildung 5: CAP-Verlauf



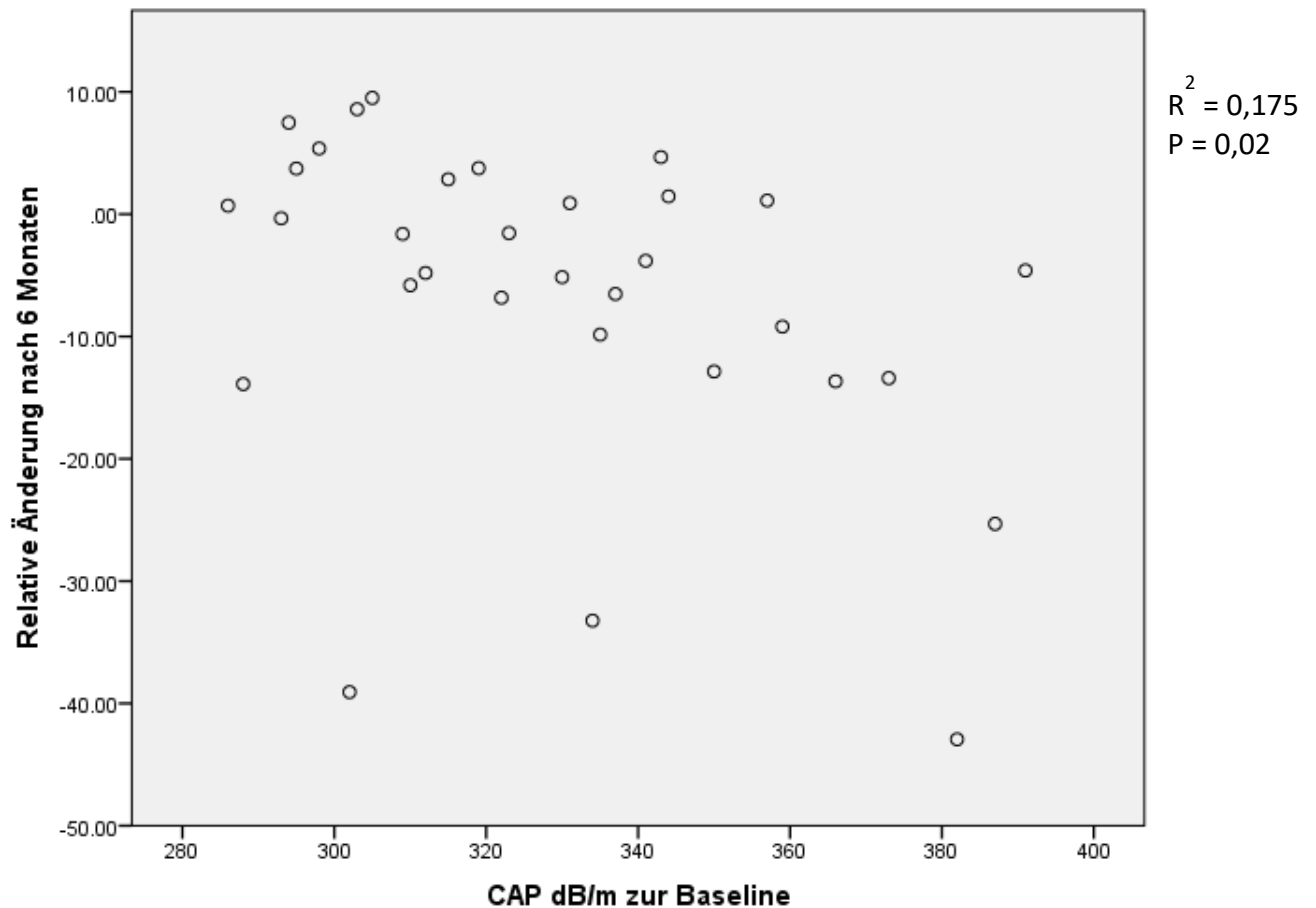
CAP-Werte am Baseline und bei jeder Verlaufskontrolle. Signifikante Reduktion des CAP-Wertes im Vergleich zum Baseline nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten Vitamin D-Supplementation im Vergleich zur Baseline (CAP: Controlled attenuation Parameter).

5.2.1 Ansprechen vs. Nicht-Ansprechen

Wir haben die Patienten zum Ende der Studie anhand ihrer CAP-Response auf die Vitamin D-Supplementation in zwei Subgruppen unterteilt. In der Response-Gruppe wurden die 21 Patienten (66%) zusammengefasst, die nach sechs Monaten Vitamin D-Supplementation (letzte Verlaufskontrolle) eine Verbesserung des CAP-Wertes aufwiesen. Die übrigen Patienten (34%) wurden der Non-Response-Subgruppe zugeteilt. Innerhalb der beiden Gruppen, aber auch zwischen den Gruppen, konnten keine Veränderungen bezüglich Geschlecht, Alter, Körperzusammensetzung oder

Leberenzymen beobachtet werden. Stattdessen wurde beim Vergleich der CAP-Werte zur Baseline und der nach sechs Monaten erkennbaren relativen CAP-Veränderung, also für die gesamte Studiendauer, eine signifikante inverse Korrelation festgestellt ($R^2 = 0,175$, $P = 0,02$) (Abbildung 6).

Abbildung 6: Relative CAP-Änderung



Signifikante inverse Korrelation zwischen Baseline-CAP-Werten und relative CAP-Änderung. Je höher die CAP-Werte zur Baseline lagen, desto stärker fiel nach 6 Monaten die relative CAP-Änderung aus (CAP: Controlled Attenuation Parameter).

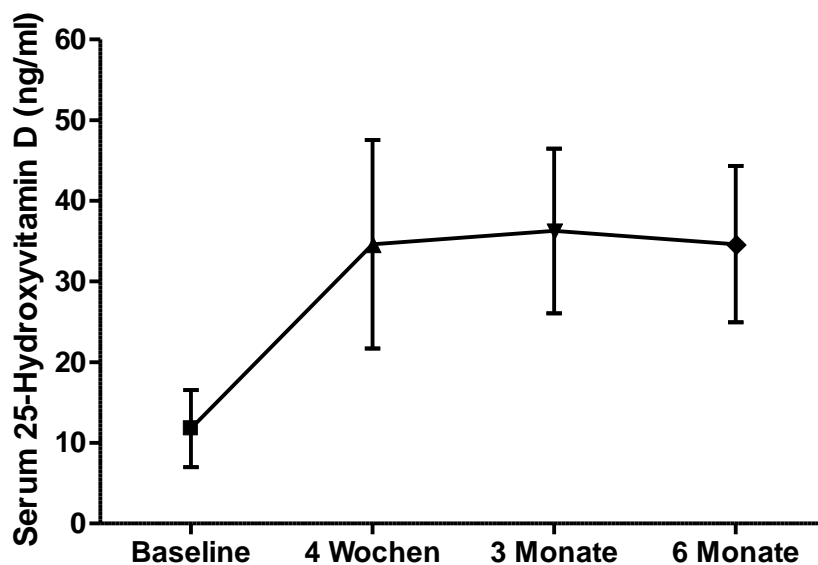
5.2.2 Virushepatitis

Zwischen Patienten mit Virushepatitis ($n = 8$) und solchen ohne Virushepatitis ($n = 32$) konnte während der Studie kein Unterschied hinsichtlich der CAP-Response beobachtet werden.

5.3 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration

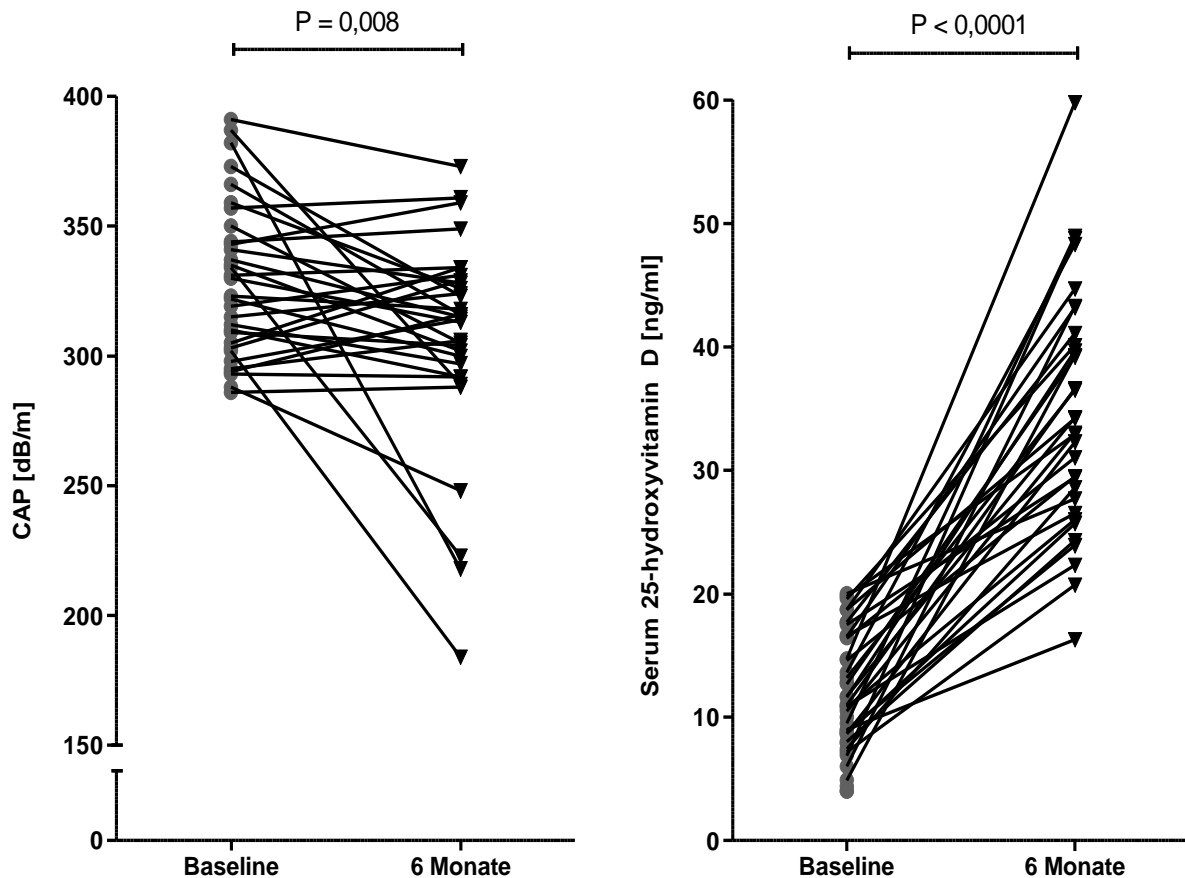
Der mittlere Vitamin D-Konzentration lag zur Baseline bei $11,8 \pm 4,8$ ng/ml. Bereits bei der ersten Verlaufskontrolle, nach vier Wochen Vitamin D-Supplementation, zeigte sich eine signifikante ($P < 0,001$) Verbesserung der Vitamin D-Konzentration ($34,6 \pm 12,9$ ng/ml) (Abbildungen 7, 8). Die meisten Patienten (68%, $n = 27$) erreichten nach 4 Wochen Intervention eine normwertige Vitamin D-Konzentration. Eine signifikante Erhöhung der Vitamin D-Konzentration im Vergleich zur Baseline konnte ebenfalls bei der zweiten und dritten Verlaufskontrolle beobachtet werden. Die Verlaufskontrollen unterschieden sich nicht signifikant. Die Vitamin D-Konzentration nach 3 Monaten und nach 6 Monaten lag bei $36,3 \pm 10,2$ ng/ml bzw. $34,8 \pm 9,8$ ng/ml (Abbildung 7).

Abbildung 7: Vitamin D-Verlauf



Signifikante Verbesserung der Vitamin D-Konzentration im Vergleich zur Baseline nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten Vitamin D-Supplementation. Nach 4 Wochen Vitamin D-Supplementation wiesen die meisten Patienten eine normale Vitamin D-Konzentration auf.

Abbildung 8: Individuelle CAP- und Vitamin D-Werte zur Baseline und nach 6 Monaten



A: Nach 6 Monaten Vitamin D-Supplementation signifikante CAP-Reduktion im Vergleich zur Baseline.

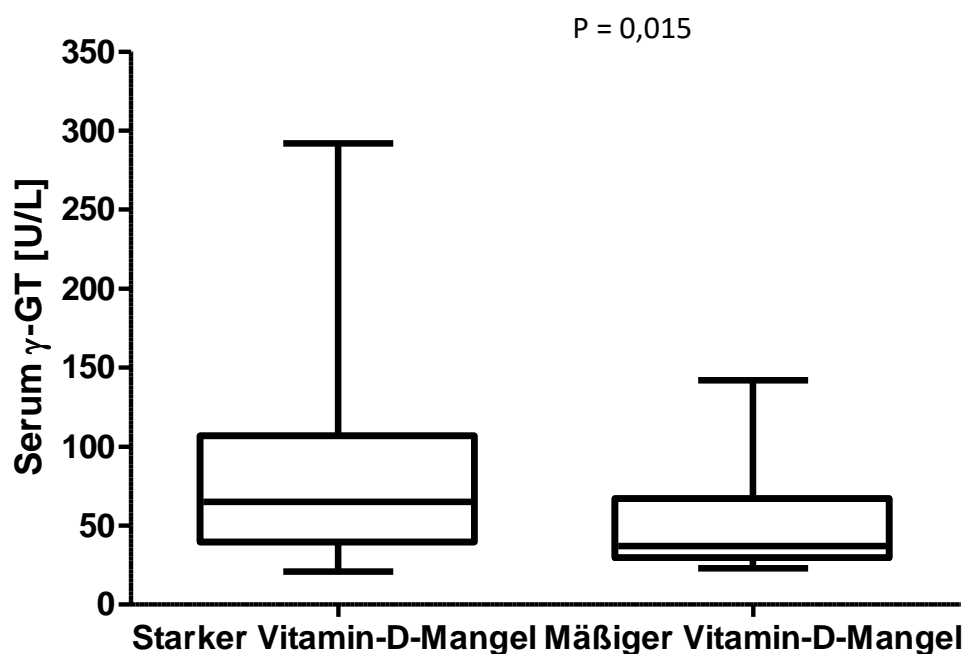
B: Nach 6 Monaten Vitamin D-Supplementation signifikante Erhöhung der Vitamin D-Konzentration (CAP: Controlled Attenuation Parameter).

5.3.1 Mäßiger vs. starker Vitamin D-Mangel

In der Subgruppenanalyse zwischen den Patienten mit mäßigem (10 - 20 ng/ml) und Patienten mit starkem (< 10 ng/ml) Vitamin D-Mangel zur Baseline konnten bei den Verlaufskontrollen keine Unterschiede bezüglich der Vitamin D-Veränderung festgestellt werden. Die CAP-Werte der 17 Patienten (42,5%) mit starkem Vitamin D-Mangel lagen höher im Vergleich zu den 23 Patienten (57,5%) mit mäßigem Vitamin D-Mangel; dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (339 ± 32 vs. 323 ± 30 dB/m). Weder eine signifikante relative CAP-Veränderung noch ein Einfluss der Jahreszeiten konnten während der Studie beobachtet werden.

Der PTH-Spiegel war bei Patienten mit starkem Vitamin D-Mangel signifikant höher als bei denen mit mäßigem Vitamin D-Mangel (51 vs. 33 pg/ml; $P = 0,001$). Nicht nur der CAP-Wert und der PTH-Spiegel, sondern auch die Leberwerte (ALT, AST, AP, γ -GT) waren bei den Patienten mit starkem Vitamin D-Mangel höher als bei Patienten mit mäßigem Vitamin D-Mangel. Allerdings konnte nur bei γ -GT ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (65 vs. 37 U/l; $P = 0,015$) (Abbildung 9).

Abbildung 9: Serum γ -GT-Aktivität zur Baseline bei starkem und bei mäßigem Vitamin D-Mangel



Zur Baseline lagen die γ -GT-Konzentrationen bei den Patienten mit starkem Vitamin D-Mangel (< 10 ng/ml) signifikant niedriger als bei Patienten mit mäßigem Vitamin D-Mangel (10 - 20 ng/ml) (γ -GT: γ -Glutamyl-Transferase).

5.4 Lebersteifigkeit

Der mediane Fibroscan-Wert, der die Lebersteifigkeit (LSM) angibt, lag zur Baseline bei 6,9 kPa (Spannweite 4,3 - 12,8 kPa). Die LSM-Werte zeigten sowohl nach 4 Wochen (Median 6,7 kPa, Spannweite 4,0 - 18,6 kPa) als auch nach 3 Monaten (Median 6,4 kPa, Spannweite 4,4 - 14,6) eine Verbesserung im Vergleich zur Baseline; allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant. Ebenso fiel die Erhöhung des LSM-Wertes bei der letzten Verlaufskontrolle nach sechsmönatiger

Vitamin D-Supplementation nicht signifikant aus (Median 7,0 kPa, Spannweite 3,6 - 12,6 kPa).

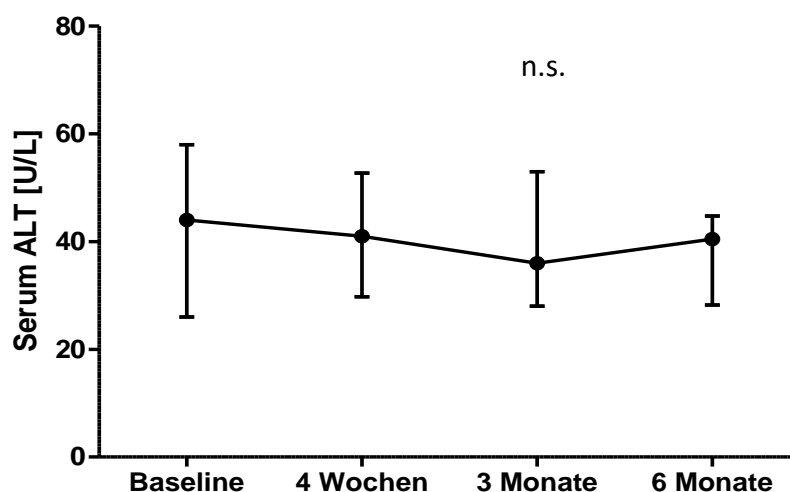
5.5 Leberwerte

5.5.1 ALT (Alanin Aminotransferase)/GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase)

Die ALT-Aktivität reduzierte sich tendenziell bei jeder Verlaufskontrolle im Vergleich zur Baseline (Tabelle 2, Abbildung 10). Eine signifikante Änderung wurde jedoch nicht beobachtet. Nicht signifikant war auch die leichte Erhöhung des ALT-Wertes, die bei der letzten Verlaufskontrolle nach 6 Monaten Vitamin D-Supplementation auftrat (Mittelwert nach 3 Monaten: 36 U/l vs. Mittelwert nach 6 Monaten: 39 U/l).

Wichtig zu erwähnen ist, dass die Anzahl der Patienten mit erhöhten ALT-Werten während der Intervention abnahm. Beim ersten Termin wiesen 51,3% (n = 20) der Patienten einen erhöhten ALT-Wert auf. Beim zweiten Termin nach vier Wochen Vitamin D-Supplementation lag der ALT-Wert bei 47,5% (n = 19) der Patienten über dem Normbereich. Nach drei und sechs Monaten Intervention zeigten nur noch 12 Patienten (36,4%) bzw. 11 Patienten (34,4%) auffällige ALT-Aktivitäten (Abbildung 10, Tabelle 2).

Abbildung 10: ALT-Verlauf

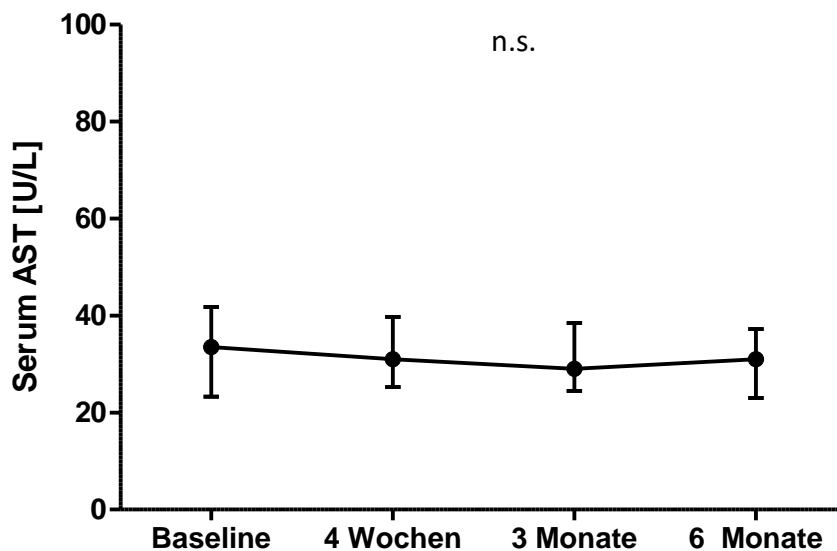


Nicht signifikante Reduktion der ALT-Aktivität im Serum nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten Vitamin D-Supplementation (ALT: Alanin-Aminotransferase, n.s.: nicht signifikant).

5.5.2 AST (Aspartat-Aminotransferase)/GOT (Glutamat-Oxalazetat-Transaminase)

Es konnte nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten Intervention ein im Vergleich zur Baseline stabiler Verlauf der AST-Werte beobachtet werden (Abbildung 11). Der mediane AST-Wert lag zur Baseline bei 33,5 U/l (18 – 60 U/l) und hat sich nach 4 Wochen auf 31 U/l (18 – 70 U/l), nach 3 Monaten auf 30 U/l (16 – 70 U/l) und nach 6 Monaten auf 31,5 U/l (15 – 94 U/l) verbessert. Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, lag zur Baseline und bei der ersten Verlaufskontrolle der AST-Wert bei neun Patienten (22,5 %) über dem Normbereich. Nach 3 und nach 6 Monaten Vitamin D-Supplementation lag der AST-Wert bei nur vier Patienten (12,1% und 12,5 %) über dem Normbereich. Diese Verbesserung war allerdings nicht signifikant.

Abbildung 11: AST-Verlauf



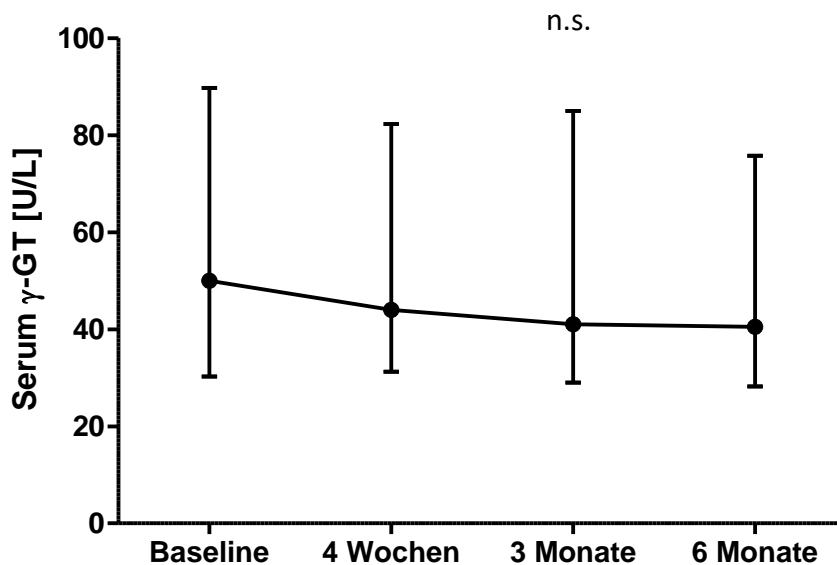
Keine signifikanten Veränderungen der AST-Aktivität im Serum während der Vitamin D-Supplementation (AST: Aspartat-Aminotransferase, n.s.: nicht signifikant).

5.5.3 γ -GT (γ -Glutamyltransferase)

Wie bei den Transaminasen (ALT/AST) verbesserten sich die γ -GT-Werte zwar bei jeder Verlaufskontrolle im Vergleich zur Baseline, diese Verbesserung war jedoch

ebenfalls nicht signifikant (von 50 U/l zur Baseline auf 44 U/l nach 4 Wochen, 41 U/l nach 3 Monaten und 41 U/l nach 6 Monaten) (Tabelle 2, Abbildung 12).

Abbildung 12: γ -GT-Verlauf



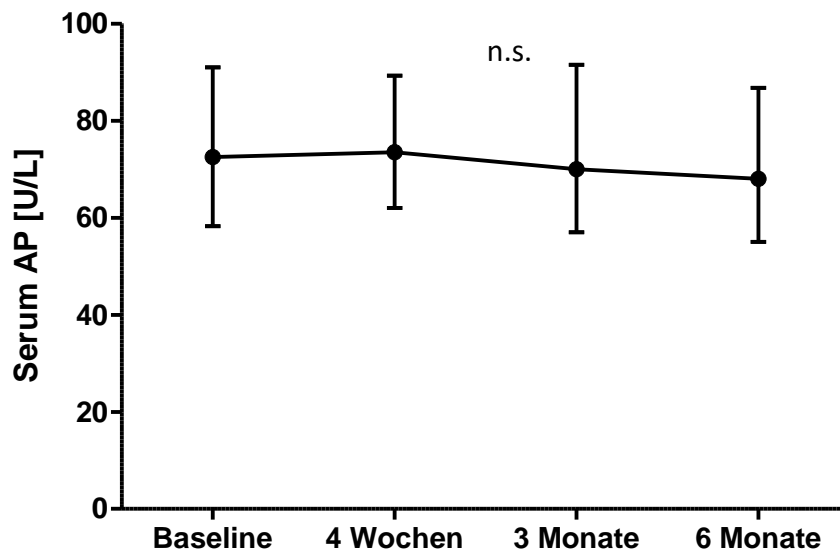
Nicht signifikante Veränderung der γ -GT – Aktivität im Serum nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten Vitamin D-Supplementation (n.s.: nicht signifikant, γ -GT: Glutamytransferase).

5.5.4 AP (Alkalische Phosphatase)

Während der Vitamin D-Supplementation konnte im Vergleich zur Baseline eine Reduktion der AP-Aktivität beobachtet werden. Diese Reduktion war allerdings, wie bei den übrigen Leberwerten, nicht signifikant. Der Median zur Baseline lag bei 75,2 U/l und sank nach 4 Wochen auf 74,8 U/l, nach 3 Monaten auf 72,7 U/l und nach 6 Monaten Intervention auf 70,0 U/l (Tabelle 2, Abbildung 13).

Insgesamt konnte bereits beim ersten Termin bei 93% der Patienten (n = 37) ein normaler AP-Wert dokumentiert werden. Dieser Prozentsatz hat sich im Verlauf der Studie weiter gebessert und erhöhte sich beim letzten Termin auf 97%, da am Ende der Vitamin D-Therapie nur ein Patient eine auffällige AP aufwies (Tabelle 2).

Abbildung 13: AP-Verlauf



Leichte, nicht signifikante Reduktion der AP-Aktivität während der Vitamin D-Supplementation (AP: Alkalische Phosphatase, n.s.: nicht signifikant).

5.5.5 Normale vs. erhöhte Leberwerte

Es wurde zur Baseline- sowie bei jeder Verlaufskontrolle eine Subgruppenanalyse zwischen Patienten mit normalen vs. Patienten mit erhöhten Leberwerten durchgeführt (Tabelle 2). Bei der Subgruppe der Patienten mit normalen Leberwerten waren die Enzymaktivitäten während der Studie stabil. Wie bereits erwähnt (5.5.1. – 5.5.4.) konnte bei den Patienten mit erhöhten Werten tendenziell eine Verbesserung der Transaminasen (ALT, AST) beobachtet werden.

Tabelle 2: Normale vs. erhöhte Leberwerte zur Baseline und bei den Verlaufskontrollen

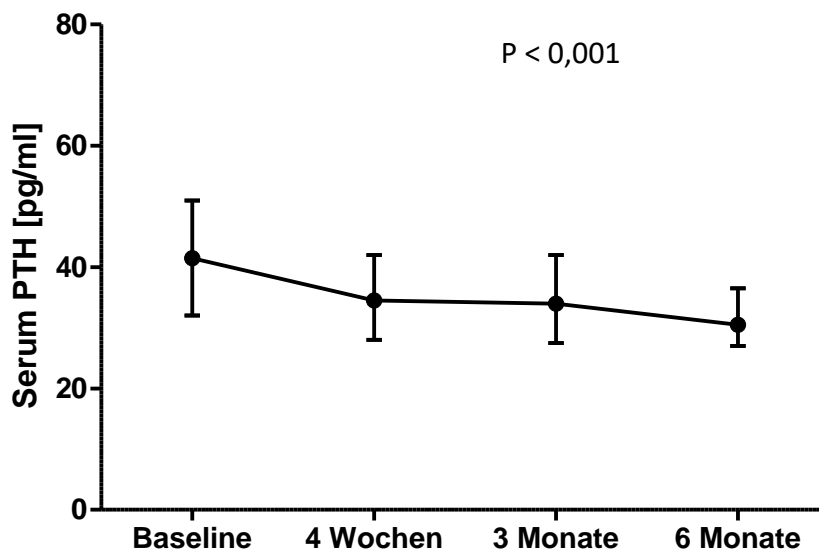
	ALT (U/l)		AST (U/l)		γ -GT (U/l)		AP (U/l)	
	Normal	Hoch	Normal	Hoch	Normal	Hoch	Normal	Hoch
Baseline	26	58	30	48	33	96	71 \pm 18	121 \pm 16
	(13 – 46)	(36 - 131)	(18 - 47)	(36 - 60)	(21 - 59)	(50 - 292)	-	-
n (%)	19 (48,7)	20 (51,3)	31 (77,5)	9 (22,5)	23 (57,5)	17 (42,5)	37 (92,5)	3 (7,5)
4 Wochen	29	51,5	28	40	32	85	72 \pm 17	112 \pm 16
	(15 - 52)	(32 - 89)	(18 - 48)	(33 - 70)	(18 - 92)	(43 - 183)	-	-
n (%)	21 (22,5)	19 (47,5)	31 (77,5)	9 (22,5)	24 (60,0)	16 (40,0)	38 (95,0)	2 (5,0)
3 Monate	28	48	29	41,5	32	96	71 \pm 19	97 \pm 31
	(12 - 51)	(23 - 96)	(16 - 50)	(28 - 55)	(18 - 66)	(28 - 225)	-	-
n (%)	21 (63,6)	12 (36,4)	29 (87,9)	4 (12,1)	19 (57,6)	14 (42,4)	31 (93,9)	2 (6,1)
6 Monate	32	44	30	33	31	81	69 \pm 17	105
	(11 - 43)	(28 - 133)	(15 - 94)	(26 - 41)	(17 - 72)	(22 - 151)	-	-
n (%)	21 (65,6)	11 (34,4)	28 (87,5)	4 (12,5)	18 (56,2)	14 (43,8)	31 (96,9)	1 (3,1)

Die Daten werden aufgrund ihrer Verteilung als Mittelwert mit Standardabweichung für ALT, AST und γ -GT und als Median mit Spannweite für AP präsentiert. (ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, γ -GT: γ -Glutamyl-Transferase, AP: Alkalische Phosphatase).

5.6 PTH (Parathormon)

Der mediane PTH-Wert lag zur Baseline mit 41,5 pg/ml (21,0 - 107,0 pg/ml) über dem Normbereich. Es konnte nach 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten Vitamin D-Supplementation und im Vergleich zur Baseline eine signifikante ($P < 0,001$) Verbesserung bzw. Reduktion des PTH-Spiegels festgestellt werden (Tabelle 2, Abbildung 14). Parallel zur bereits nach vierwöchiger Vitamin D-Supplementation erkennbaren Verbesserung der Vitamin D-Konzentration konnte eine Reduktion des PTH-Spiegels beobachtet werden. Der mediane PTH-Wert lag nach 4 Wochen bei 34,5 pg/ml (21,0 - 95,0 pg/ml), nach 3 Monaten bei 34,0 pg/ml (9,0 – 67,0 pg/ml) und nach 6 Monaten bei 30,5 pg/ml (16,0 - 52,0 pg/ml). Wie bei der Vitamin D-Konzentration und bei den CAP-Werten konnten zwischen den Verlaufskontrollen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Abbildung 14: PTH-Verlauf



Signifikante PTH-Reduktion nach 4 Wochen, nach 3 und nach 6 Monaten Vitamin D-Supplementation (PTH: Parathormon, n.s.: nicht signifikant).

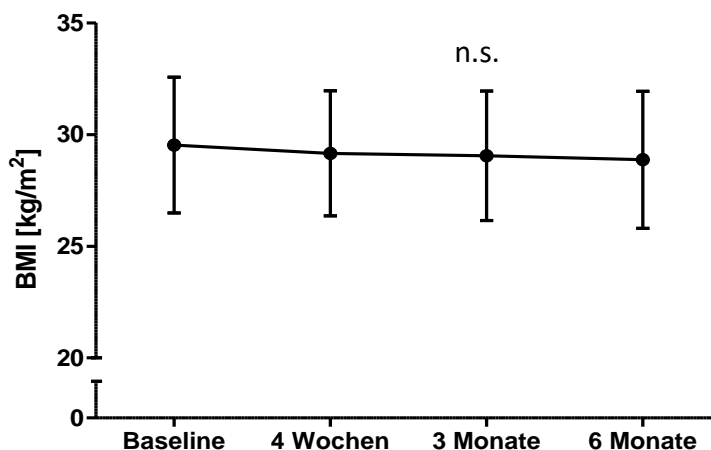
5.7 Körperzusammensetzung

Der mittlere BMI-Wert zur Baseline lag bei $29,5 \pm 3,0 \text{ kg/m}^2$. Obwohl das Gewicht bzw. der BMI kein Ein- oder Ausschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie war, wies keiner der 40 Patienten zur Baseline einen normalen BMI-Wert auf. Über die Hälfte der Patienten (55%, $n = 22$) waren zur Baseline übergewichtig ($25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} \leq 30 \text{ kg/m}^2$). Die übrigen 18 Patienten (45%) waren, mit einem BMI-Wert $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, adipös. Der BMI-Wert blieb im Verlauf der Studie stabil, so dass der mittlere BMI-Wert am Ende der Studie (nach 6 Monaten) bei $28,9 \pm 3,1 \text{ kg/m}^2$ lag (Tabelle 2, Abbildung 15).

Während der Studie konnten ebenfalls keine Veränderungen bei der Körperfettmasse beobachtet werden (Abbildung 16). Zur Baseline lag der mittlere Wert bei $32,3 \pm 8,2\%$, und dieser änderte sich bis zum Ende der Studie und der sechsmonatigen Intervention nicht ($30,1 \pm 9,0\%$) (Tabelle 2, Abbildung 16).

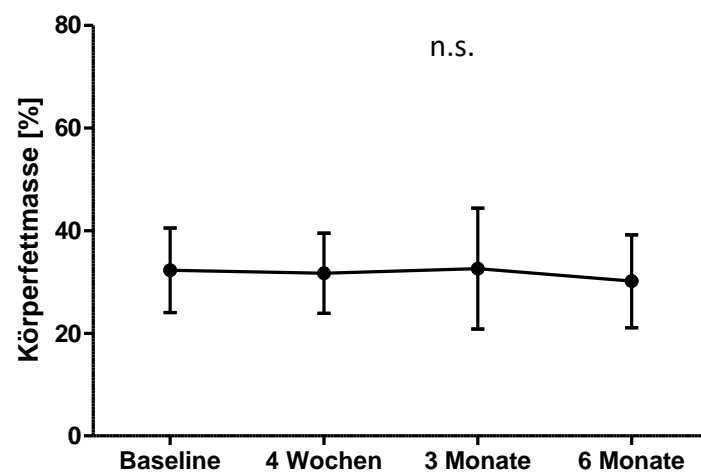
Veränderungen des viszeralen Fettes konnten während der Vitamin D-Supplementation ebenfalls nicht beobachtet werden. Zum Studienbeginn lag bei 60,5% der Patienten ($n = 23$) der Viszeral-Fett-Index im Normbereich (< 12). Die prozentuale Zunahme dieses Anteils während des Studienverlaufs bis auf 74,2 % ($n = 23$) am Ende der Studie war nicht signifikant (Tabelle 2).

Abbildung 15: BMI-Verlauf



Der mittlere BMI-Wert blieb während der gesamten Studie unverändert (BMI: body mass index, n.s.. nicht signifikant).

Abbildung 16: Verlauf der Körperfettmasse



Die Körperfettmasse zeigte während der Intervention keine signifikanten Veränderungen (n.s.: nicht signifikant).

6 DISKUSSION

6.1 Signifikante Reduktion der Steatose durch Vitamin D-Supplementation

Diese Studie zeigt, dass die Behandlung des Vitamin D-Mangels durch die Gabe von Vitamin D zu einer durch CAP-Messung nachweisbaren Reduktion der Steatosis hepatis führt. Hiermit wurde unsere Hypothese bestätigt, dass durch die kurzfristige Vitamin D-Supplementation eine Verbesserung der Steatose erreicht werden kann. Die absolute CAP-Reduktion nach 6 Monaten Vitamin D-Supplementation lag bei 23 dB/m und beträgt ungefähr einen halben Steatose-Grad, den de Ledinghen beim Vergleich von CAP-Messung und Leberbiopsie vorgeschlagen haben (28).

Die stärkste CAP-Reduktion wurde bereits nach 4 Wochen Vitamin D-Intervention beobachtet, zum selben Zeitpunkt zu dem auch die Vitamin D-Konzentration die stärkste Verbesserung aufwies. Dieses Phänomen kann durch die von Heaney entwickelte Theorie zur Wirkung einer Vitamin-Supplementation erklärt werden (49).

Abbildung 17: Effekt der Vitamin-Supplementation auf die Vitamin-Konzentration

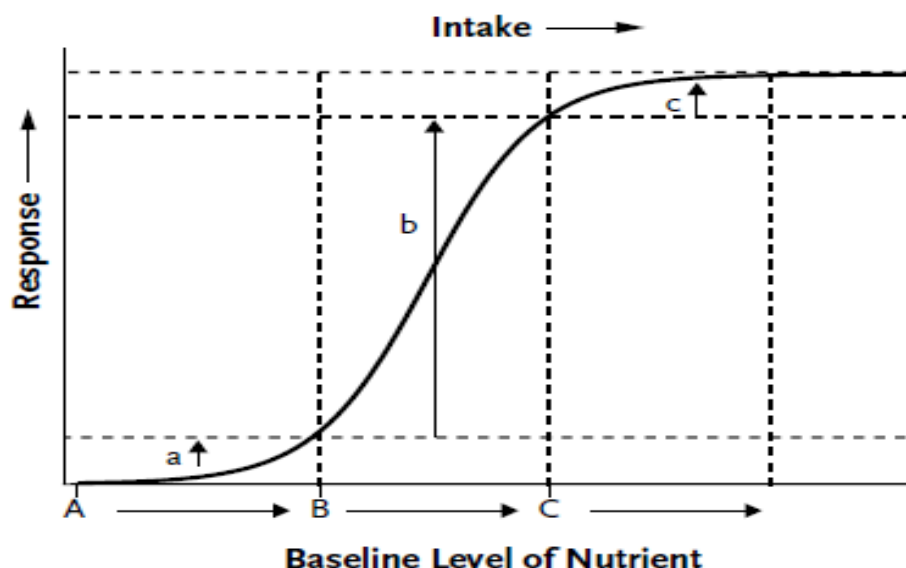


Abbildung aus Heaney et al. NEJM 2012;367:77-8
Reproduced with permission from (scientific reference citation),
Copyright Massachusetts Medical Society

Dieser Theorie zufolge tritt dann ein maximaler Effekt auf, wenn Patienten mit hochgradigem Vitamin-Mangel mit einer ausreichenden Vitamin-Dosis behandelt werden. Hingegen ist der Effekt minimal, wenn die Vitamin-Supplementation bei Patienten ohne Vitamin-Mangel durchgeführt wird (Abbildung 17). Dies erklärt auch, warum bei der zweiten und dritten Verlaufskontrolle (nach 3 und nach 6 Monaten) keine weitere Verbesserung der Vitamin D-Konzentration (und der CAP-Werte) zu erkennen war, obwohl die Patienten weiterhin ihre Vitamin D-Tabletten eingenommen haben.

Bei der Vitamin D-Konzentration trat nach nur 4 Wochen Vitamin D-Supplementation eine Erhöhung auf, zum gleichen Zeitpunkt hatten sogar die meisten Patienten eine normale Vitamin D-Konzentration erreicht. Heaneys Theorie liefert die Erklärung dafür, dass die gewählte Vitamin D-Dosis ausreichend war, so dass unsere Patienten ausgehend von einem Vitamin D-Mangel eine Erhöhung der Vitamin D-Konzentration erreichten. Passend hinzu wies der Parathormon (PTH)-Spiegel bereits nach 4 Wochen Vitamin D-Intervention eine Reduktion auf.

6.2 Risikofaktoren für NAFLD/Behandlungsoptionen

Viele verschiedene Faktoren gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD. Die zwei wichtigsten Risikofaktoren sind die Adipositas und die Insulinresistenz bzw. der Diabetes mellitus Typ 2 (80). Eine Assoziation zwischen Vitamin D-Mangel und Adipositas wurde bereits durch verschiedene Studien (44, 46) sowie durch zwei Metaanalysen dokumentiert (78, 106). Die Prävalenz der NAFLD nimmt mit der Höhe des BMI bzw. dem Bauchumfang zu (38). NAFLD besteht bei über 90% der Adipösen und bei über 70% der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (94). Demnach tragen eine Ernährung, die zu Adipositas oder Übergewicht führt, sowie eine nicht ausreichende körperliche Aktivität zu Entwicklung einer NAFLD bei. Ein hoher Triglyzeride-Spiegel und ein niedriger HDL-Spiegel zählen zusätzlich zu den Risikofaktoren für die Steatose-Entwicklung. Bei jedem zweiten Patienten mit Dyslipidämie erscheint eine NAFLD (21).

Eine genetische Disposition zählt ebenfalls zu den Risikofaktoren einer NAFLD (36). Es wurde bereits eine Verbindung von Genvariationen, insbesondere der Gene Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) und Transmembrane 6 Superfamily 2 (TM6SF2) mit dem Vorliegen einer NAFLD nachgewiesen (3, 4, 83).

Eine Assoziation zwischen intestinalem Mikrobiom und NAFLD unabhängig vom BMI weist daraufhin, dass qualitative Veränderungen des Stuhlmikrobioms ebenfalls eine Rolle bei der NAFLD-Entwicklung spielen könnten (12, 71).

Zur Behandlung der NAFLD wird eine Therapie wie bei Insulinresistenz mittels Lebensstiländerung im Sinne von Gewichtsreduktion und vermehrter körperlicher Aktivität empfohlen (72). Ziel der Behandlung ist es, die NAFLD-Progression zu vermeiden (72). Eine Lebensstiländerung stellt eine praktisch schwer umzusetzende Methode dar, da ihr Erfolg stark von der Compliance des Patienten abhängt (72).

Die bariatrische Chirurgie zeigt positive Ergebnisse bezüglich der Verbesserung der NAFLD, allerdings stellt die NAFLD per se keine Indikation zur bariatrischen Operation dar (26). Bis dato besteht keine zugelassene Medikation zur Therapie der NAFLD (72). Die bisher verwendete empirische Medikation mit UDCA Ursodesoxycholsäure (UDCA), Vitamin E oder S-Adenosyl-Methionin (SAME) wird in den aktuellen Leitlinien in Deutschland nicht empfohlen (26). Obeticholsäure zeigte in der FLINT-Studie (The Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment Trial) positive Effekte, allerdings wurde bei der Interventions-Gruppe als Nebenwirkung ein Pruritus häufiger beobachtet als in der Placebo-Gruppe, und die langfristigen Effekte der Obeticholsäure-Therapie sind nicht bekannt (74). Medikamente, deren Wirkung auf die Reduktion der Fibrose fokussiert ist sowie Probiotika werden noch evaluiert und können eventuell zukünftig therapeutisch angewendet werden (26). Mehrere Medikamente (u.a. Antidiabetika) sowie Nahrungsergänzungsmittel (u.a. Vitamin D, Folsäure) werden noch untersucht und stellen ebenso potenzielle Bestandteile einer zukünftigen NAFLD-Therapie dar.

6.3 Assoziation zwischen NAFLD und Vitamin D-Mangel

Durch zahlreiche Studien (8, 24, 27, 52, 55) sowie bis dato zwei Metaanalysen (35, 100) ist eine Assoziation zwischen Vitamin D-Mangel und NAFLD belegt. Chung et al. (24) führten eine Querschnittsstudie mit insgesamt 1.660 NAFLD-Patienten durch. Hier zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen NAFLD-Schweregrad und Vitamin D-Konzentration im Serum. Diese inverse Korrelation wurde durch Jablonski et al. (52) in einer Studie bei 607 NAFLD-Patienten bestätigt. In der Metaanalyse von 17 Beobachtungsstudien konnte gezeigt werden, dass NAFLD-Patienten im Mittel 0,36 ng/dl niedrigere 25-Hydroxyvitamin-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden

Kontrollen hatten und ein 26% höheres Risiko, einen Vitamin D-Mangel zu entwickeln, aufwiesen (35). Niedrigere Vitamin D-Konzentrationen und ein um 26% erhöhtes Risiko für einen Vitamin D-Mangel bei den NAFLD-Patienten konnte ebenso in der kürzlich publizierten Metaanalyse von Wang et al. (100) nachgewiesen werden. Rhee et al. (81) konnten in einer koreanischen Studie mit 6.567 Patienten zeigen, dass Patienten mit höherer Vitamin D-Konzentration ($> 42,2 \text{ nmol/L}$, entspricht $16,9 \text{ ng/ml}$) im Vergleich zu den Patienten mit niedriger Vitamin D-Konzentration ($\leq 42,2 \text{ nmol/L}$) ein niedrigeres Risiko zur Entwicklung einer NAFLD aufweisen.

Trotz des nachgewiesenen Zusammenhangs zwischen NAFLD und Vitamin D-Mangel wird kontrovers diskutiert, ob es sich um einen kausalen Faktor oder eine Folgeerscheinung handelt. Lee et al. (62) zeigten, dass die Steatose-Patienten mit starkem Vitamin D-Mangel ($< 10 \text{ ng/ml}$) gegenüber Steatose-Patienten mit einer Vitamin D-Konzentration $> 10 \text{ ng/ml}$ ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer abdominalen Adipositas sowie eine erhöhte Prävalenz des metabolischen Syndroms aufweisen (62).

In einer anderen kürzlich publizierten Studie untersuchten Brill et al. (13) 239 Patienten, um eine Verbindung zwischen Vitamin D-Mangel und Schweregrad der NASH herauszufinden, wozu sie ^1H -Magnetresonanz-Spektroskopie (^1H -MRS) und Leberbiopsie anwendeten. Hierbei war bezüglich der Triglyzerid-Akkumulation der Leber zwischen Patienten mit normalem Vitamin D-Status und Patienten mit Vitamin D-Mangel jedoch kein Unterschied feststellbar. Weitere Studien und funktionelle Untersuchungen der Wirkungen des Vitamins D sind nötig, um die Widersprüche zu klären.

6.4 Effekt der Vitamin D-Supplementation auf die Leber

Dem Effekt der Vitamin D-Supplementation auf die Leber wurde in der Studie von Hochrath et al. (50) nachgegangen, wobei *Abcb4*^{-/-}-Mäuse als Modelle einer sklerosierenden Cholangitis mit verschiedenen Vitamin D-Dosierungen behandelt wurden. Die Mäuse mit der niedrig dosierten Vitamin D-Diät wiesen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine ausgeprägte Fibrose und eine höhere Kollagen-Akkumulation auf. Aus dem Vergleich der hochdosierten mit der normaldosierten Vitamin D-Diät ergaben sich keine Vorteile, was wiederum mit der Heaneys Theorie vereinbar ist,

wonach der höchste Vitamin-Supplementationseffekt beim Erreichen einer normalen Konzentration nach vorherigem Vitaminmangel auftritt und dass die Fortsetzung der hochdosierten Vitamingabe nicht zu weiteren positiven Effekten führt.

Die doppelblinde Plazebo-kontrollierte Studie von Sharifi et al. (90) ist die einzige, in der die Effekte der Vitamin D-Supplementation auf die Steatosis hepatis bei Menschen direkt untersucht wurden. Hierbei wurden 53 mit Ultraschall und ALT-Messungen evaluierte NAFLD-Patienten untersucht. Den Probanden wurde über einen Zeitraum von 4 Monaten alle 14 Tage entweder als Intervention eine Vitamin D₃-Dosis (50.000 IE) oder Plazebo verabreicht. Bei der Interventionsgruppe konnte, evaluiert durch hochsensitives CRP (hs-CRP), eine Reduktion der systemischen Inflammation festgestellt werden, während sich bei der Plazebogruppe die CRP-Werte erhöhten. Leberenzyme und durch Ultraschall evaluierter Steatosegrad wiesen trotz der Gewichtsabnahme keine signifikanten Veränderungen auf (90).

In einer weiteren Plazebo-kontrollierten Studie mit 60 NAFLD-Patienten, wobei Ultraschall zur Evaluation zum Einsatz kam, waren bei der Interventionsgruppe nach Vitamin D-Supplementation im Vergleich zu der Plazebogruppe ebenfalls keine signifikanten Effekte auf CRP, Transaminasen und Triglyzeride im Serum feststellbar (40). Allerdings wurde bei diesen Studien die Leberverfettung mittels Ultraschall evaluiert. Der Literatur zufolge ist die Sensitivität der Ultraschall-Untersuchung zur Detektion einer Steatose um 30% niedriger als die der CAP-Messung (20, 85).

Kitson et al. (57) führten bei 12 Patienten mit histologisch gesicherter NASH und NAFLD-Activity-Score ≥ 4 eine hochdosierte Vitamin D-Supplementation (25.000 IE Vitamin D₃/Woche) durch. Bei der Kontrolle-Leberbiopsie nach 24 Wochen konnten für NAFLD-Activity-Score, Leberwerte und Insulinresistenz keine Veränderungen festgestellt werden. Trotz der hohen Sensitivität der Leberbiopsie stellt die kleine Patientenzahl bei dieser Studie eine Limitation dar, zudem lag die mittlere Vitamin D-Konzentration zur Baseline mit 25 ± 12 ng/ml im Normbereich, so dass - wie von der Heaney-Theorie vorausgesagt - die Vitamin D-Supplementation keine ausgeprägten Effekte haben konnte (49).

In einer experimentalen Studie entwickelte sich bei adipösen Ratten mit NAFLD und Vitamin D-Mangel im Vergleich zu Tieren mit suffizienter Vitamin D-Konzentration mehr Steatose und hepatische Inflammation (84).

Die sechsmonatige Vitamin D-Intervention zeigte in unserer Studie keine signifikanten Auswirkungen auf die Transaminasen und die Cholestaseparameter. Wie aus den Abbildungen 10-13 zu ersehen ist, konnte bei den Patienten mit erhöhten Leberwerten während der Vitamin D-Supplementation eine tendenzielle Verbesserung beobachtet werden. Ebenso konnten Kitson et al. (57) und Foroughi et al. (39) keine Veränderung der Leberwerte nach Vitamin D-Supplementation beobachten. Während Skaaby et al. (91) bei Patienten mit Vitamin D-Mangel ein im Vergleich zu den Patienten mit normaler Vitamin D-Konzentration erhöhtes Risiko für Leberwerterhöhung feststellten, stellten Mofrad et al. (70) in einer retrospektiven Studie bei 101 Patienten fest, dass auch Patienten mit normaler ALT das gesamte histologische Spektrum der NAFLD aufweisen können und dass auch bei normaler ALT-Aktivität eine Steatohepatitis mit Fibrose nicht ausgeschlossen werden kann.

6.5 Pathophysiologie der Wirkung des Vitamins-D auf die Steatose

Die von uns bisher gewonnenen Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass sich Vitamin D protektiv auf die Leberpathologie und die Entwicklung einer NAFLD auswirkt. Vitamin D beeinflusst dieselben pathophysiologischen Wege, die auch zur Entwicklung der NAFLD beitragen, insbesondere die hepatische Inflammation und den oxidativen Stress. Vitamin D bindet an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) (10, 34). In einer tierexperimentalen Studie konnte gezeigt werden, dass VDR die Entwicklung von Leberinflammation und Fibrose protektiv beeinflusst (30). Barchetta et al. (8) haben in einer Studie bei Patienten eine inverse Korrelation zwischen VDR-Aktivierung und Schweregrad der NAFLD beobachtet. Die genaue biologische Aktivität des Vitamins D und sein Einfluss auf die NAFLD werden weiter erforscht, da zu ihrem Verständnis wahrscheinlich eine Vielzahl von Faktoren zu berücksichtigen ist. Mögliche weitere pathophysiologische Mechanismen, durch die Vitamin D die Entwicklung der NAFLD unterdrückt, sind (34, 45) die Inhibition der hepatozellulären Apoptose, die Veränderung des intestinalen Mikrobioms, die Suppression proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren des oxidativen Stresses und die Modulation der Adipokin-Ausschüttung.

6.5.1 Inhibition der hepatozellulären Apoptose

Es wurde postuliert, dass Vitamin D die Apoptose der Hepatozyten verhindert (45). Zhang et al. (110) haben gezeigt, dass durch die Gabe von Calcitriol bei Ratten, die akute Abstoßung von Lebertransplantaten unterdrückt. Vitamin D reguliert in der Leber die Ausschüttung von Apoptose-assoziierten Proteinen (110). Außerdem hemmt Calcitriol die Ausschüttung des Proteins FasL, das für die Abwehrtätigkeit zytotoxischer T-Zellen gegen fremde Zellen wichtig ist (110).

6.5.2 Veränderung des Darm-Mikrobioms

Die Translokation bakterieller Produkte in die portalen Zirkulation wird durch die intestinalen Epithelzellen verhindert. Wenn die intestinale Barriere ineffektiv ist, sind die Hepatozyten nicht gegen die bakteriellen Produkte geschützt. Diese Translokation bakterieller Produkte kann die Leberhomöostase beeinflussen und zu Immunreaktionen oder Inflammation führen (89). Eine Verbindung zwischen vermehrter intestinaler Permeabilität und bakterieller Dünndarmfehlbesiedlung bei Patienten mit NAFLD konnte in einer Studie von Miele et al. (68) beobachtet werden. Roth et al. (84) zeigten, dass sich das Mikrobiom bei Vitamin D-Mangel verändern kann und dies zur Ausschüttung von Endotoxinen und zur Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) führt. In dieser Studie war bei Ratten mit Vitamin D-Mangel, die eine kalorienreiche Diät erhielten, die Expression von TLR-2, -4 und -9 erhöht. Es wird außerdem eine Verbindung zwischen TLR-4 und NAFLD sowie bakteriellen Lipopolysacchariden beschrieben (17, 53, 68), zum genaueren Verständnis dieser Mechanismen sind jedoch noch weitere Arbeiten erforderlich.

6.5.3 Suppression der proinflammatorischen Zytokine und der Faktoren, die zu oxidativem Stress/Insulinresistenz führen

Insulinresistenz ist bei der NAFLD-Pathogenese der wichtigste Faktor und an der Entstehung von oxidativem Stress und Lipotoxizität beteiligt (1, 34). Daher geht die durch die Fettakkumulation verursachte Lebersteatose mit einer chronischen Leberinflammation einher. In einer Studie von Cai et al. (16) konnte bei Mäusen mit fettreicher Diät eine erhöhte Aktivität des Nuclear Factors- κ B (NF- κ B) festgestellt werden, was in Verbindung mit einer erhöhten Ausschüttung von

proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-6, IL-1 β) und der Aktivierung von Kupferzellen stand. Diese Zytokine verstärken die Ausbildung aller Merkmale der NASH, so der Nekrose/Apoptose der Hepatozyten, der Neutrophilen-Chemotaxis und der Aktivierung hepatischer Sternzellen (34). Bei NASH-Patienten konnte im Vergleich zu adipösen Patienten mit normaler Leber eine erhöhte Expression von Zytokin-Genen in die Leber beobachtet werden (25).

Die Rolle von Vitamin D bei diesen Pathomechanismen wird weiter erforscht. In der randomisierten, doppelblinden Studie von Neyestani et al. (75) bei Typ-2-Diabetikern führte die tägliche Vitamin D-Einnahme über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer Erhöhung der Serum-Adipokine, sowie zu einer Reduktion der Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β .

In einer Metaanalyse von 10 Studien mit insgesamt 924 Patienten zeigten Chen et al. (22) einen positiven Effekt der Vitamin D-Supplementation auf die Reduktion des hochsensitiven CRP-Wertes als Hinweis auf die antiinflammatorische Wirkung des Vitamins D.

In einer Studie mit Ratten fielen bei Tieren mit Vitamin D-Mangel und hyperkalorischer Diät die lobuläre Inflammation, der NAFLD-Aktivitäts-Score, die Interleukin-Ausschüttung sowie der oxidative Stress signifikant stärker aus als bei Tieren ohne Vitamin D-Mangel. Daraus wurde gefordert, dass der Vitamin D-Mangel zu einer Induktion von hepatischen Genen führt, die die hepatische Inflammation und den oxidativen Stress steuern (84). Einer anderen Studie zufolge erhöhte sich durch die Vitamin D-Supplementation die Genexpression der für die antioxidative Abwehr zuständigen Mediatoren (42).

6.6 Vorteile der Studie

Die Stärke unserer Studie liegt in ihrer prospektiven Natur. Zudem wurden nur Patienten mit einem Vitamin D-Mangel eingeschlossen, während Patienten mit unzureichendem oder normalem Vitamin D-Status aus der Studie ausgeschlossen wurden. Außerdem war es uns möglich, oft Verlaufskontrollen durchzuführen, da die CAP-Messung nicht-invasiv, einfach und nicht mit Risiken verbunden war. Von daher war ein Monitoring mit insgesamt vier Besuchsterminen für die Patienten problemlos realisierbar, ohne dass ihre Motivation nachgelassen hätte. Die CAP-Messung, die in unserer Studie zur Evaluation der Steatose verwendet wurde, ist eine neue, nicht-

invasive, kostengünstige und viel versprechende Methode zur Beurteilung der Lebersteatose. In einer Metaanalyse von 11 Studien von Wang et al. (101) ließ sich eine gute Sensitivität der CAP-Messung zur Evaluation und Quantifizierung der Steatosebelegen. Allerdings ist diese Methode mit Limitationen behaftet, z.B. einer reduzierten Genauigkeit bei Patienten mit hohem BMI (101), die ihre Zuverlässigkeit einschränken können.

Als weitere Erkenntnis aus unserer Studie ergab sich, dass für den Behandlungserfolg weder eine Lebensstiländerung noch eine Gewichtsreduktion erforderlich waren. Es ist bereits bekannt, dass die Reduktion des Risikos einer NAFLD durch eine Lebensstiländerung mit Gewichtsreduktion und vermehrter körperlicher Aktivität erreicht werden kann (65). In einer Metaanalyse von Keating et al. (56) konnte gezeigt werden, dass alleine die körperliche Aktivität ohne Gewichtsreduktion zu einer Verbesserung der NAFLD führen kann. Da körperliche Aktivität in den meisten Fällen im Freien stattfindet, können möglicherweise die Sonnenexposition und folglich die Erhöhung der Vitamin D-Konzentration hierzu beitragen. Bei den Patienten unserer Studie wurde die Sonnenexposition nicht quantitativ gemessen, sondern lediglich anamnestisch anhand des Fragebogens ermittelt, wobei die Patienten die gesamte pro Tag im Freien verbrachte Zeit anzugeben hatten. Hier muss betont werden, dass die Patienten unserer Studie zu keiner Änderung ihrer Diät oder körperlichen Aktivität aufgefordert wurden. Obwohl zu Studienbeginn eine ausführliche Aufklärung bezüglich der bestehenden Steatose, der damit verbundenen potenziellen künftigen Gesundheitsschädigungen und einer Lebensstiländerung als Behandlungsmöglichkeit stattfand, konnten am Ende der Studie keine Gewichtsreduktion und keine Steigerung der körperlichen Aktivität festgestellt werden. Das erklärt, warum weder BMI noch Körperfettmasse am Ende der Intervention eine Verbesserung aufwiesen. Daher ist die signifikante Verbesserung der Steatose unserer Studie mit hoher Wahrscheinlichkeit primär durch die Vitamin D-Supplementation und nicht durch Gewichtsreduktion oder intensivierte körperliche Aktivität verursacht.

Die NAFLD präsentiert sich in den Industrieländern mit einer hohen Prävalenz, global geschätzt aktuell ca. ein Viertel der Welt-Population (109). Die steigende Prävalenz eines Vitamin D-Mangels bei 5 bis 30% der Patienten mit NAFLD (8) und bis zu 90% bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen (5, 43) verdeutlicht die Relevanz

des Themas unserer Studie. Außerdem nimmt die Prävalenz der Adipositas weltweit zu. Es wird geschätzt, dass sich die Prävalenz der Adipositas in den letzten 30 Jahren fast verdoppelt hat (77) und dass sie nicht nur bei Erwachsenen, sondern auch bei Kindern der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer NAFLD ist (98). Die Prävalenz der NAFLD bei adipösen Kindern und Jugendlichen liegt bei 50-80% im Vergleich zu 2-7% bei normalem Körpergewicht (98). Es wird postuliert, dass innerhalb den nächsten 10 Jahre bei Kindern und Jugendlichen der westlichen Länder die pädiatrische NAFLD zur häufigsten chronischen Lebererkrankung werden wird (98). Da aktuell eine spezifische Medikation zur Behandlung der NAFLD noch fehlt (72), könnte die Vitamin D-Gabe zukünftig ein elementarer Teil der Behandlung von NAFLD-Patienten sein.

6.7 Limitationen der Studie

Es muss eingeräumt werden, dass das Fehlen einer Kontrolle-Gruppe die Aussagekraft unserer Studie einschränkt, da so ein Placebo-Effekt nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine zweite Limitation stellt die kleine Patientenzahl dar ($n = 40$). Außerdem handelt es sich bei der CAP-Messung noch um eine neue Methode, die die Leberbiopsie als „Gold-Standard“ zur Diagnose und Graduierung einer Steatose nicht vollständig ersetzen kann. Zweifellos sind noch größere randomisierte und kontrollierte Studien notwendig, um unsere Ergebnisse zu bestätigen. In unserer Studie konnte keine Verbesserung der mittels Elastographie quantifizierenden Fibrose festgestellt werden. Hier muss allerdings betont werden, dass das Entstehen einer höhergradigen Fibrose (LSM-Werte > 13 kPa) ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme an unserer Studie war.

6.8 Perspektiven

Mehrere große randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien sind zukünftig notwendig, um die Ergebnisse unserer Studie zu belegen und die von uns verwandte Untersuchungsmethode weiter zu evaluieren. Insbesondere bleiben anhand unserer Studie drei Punkte zu klären:

- die biologische Aktivität und der genaue Wirkmechanismus von Vitamin D auf die Steatosis hepatis;

- die Vorteile einer Vitamin D-Supplementation bei Steatosis hepatis; und
- die genaue Sensitivität und Spezifität der CAP-Messung und ihrer klinischen Relevanz für die Diagnose und Verlaufskontrollen der Steatosis hepatis.

LITERATUR

1. **Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, and Vidali M.** Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 22 Suppl 2: 71-73, 2005.
2. **Alberti KG, Zimmet P, and Shaw J.** Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 23: 469-480, 2006.
3. **Anstee QM, Seth D, and Day CP.** Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 150: 1728-1744.e1727, 2016.
4. **Arslanow A, Stokes CS, Weber SN, Grunhage F, Lammert F, and Krawczyk M.** The common PNPLA3 variant p.I148M is associated with liver fat contents as quantified by controlled attenuation parameter (CAP). *Liver Int* 36: 418-426, 2016.
5. **Arteh J, Narra S, and Nair S.** Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Digestive diseases and sciences* 55: 2624-2628, 2010.
6. **Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, and Monteiro MM.** AUDIT. The Alcohol Use Disorders Identification Test. Guidelines for use in Primary Health Care, 2nd edn. World Health Organisation, Geneva. 2001.
7. **Banim PJ, Luben RN, Wareham NJ, Sharp SJ, Khaw KT, and Hart AR.** Physical activity reduces the risk of symptomatic gallstones: a prospective cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22: 983-988, 2010.
8. **Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, and Cavallo MG.** Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC medicine* 9: 85, 2011.
9. **Bedossa P, and Patel K.** Biopsy and Noninvasive Methods to Assess Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 150: 1811-1822 e1814, 2016.
10. **Bikle D.** Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94: 26-34, 2009.
11. **Blechacz B, and Stremmel W.** NASH - Nichtalkoholische Steatohepatitis. 41 1: 2003.
12. **Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, Guy CD, Seed PC, Rawls JF, David LA, Hunault G, Oberti F, Cales P, and Diehl AM.** The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 63: 764-775, 2016.
13. **Bril F, Maximos M, Portillo-Sanchez P, Biernacki D, Lomonaco R, Subbarayan S, Correa M, Lo M, Suman A, and Cusi K.** Relationship of vitamin D with insulin resistance and disease severity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 62: 405-411, 2015.
14. **Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, and Hobbs HH.** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40: 1387-1395, 2004.
15. **Brunner R, Dunbar-Jacob J, Leboff MS, Granek I, Bowen D, Snetselaar LG, Shumaker SA, Ockene J, Rosal M, Wactawski-Wende J, Cauley J, Cochrane B, Tinker L, Jackson R, Wang CY, and Wu L.** Predictors of adherence in the

Women's Health Initiative Calcium and Vitamin D Trial. *Behavioral medicine (Washington, DC)* 34: 145-155, 2009.

16. **Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, and Shoelson SE.** Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine* 11: 183-190, 2005.
17. **Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, and Burcelin R.** Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481, 2008.
18. **Cassinotto C, Boursier J, de Ledinghen V, Lebigot J, Lapuyade B, Cales P, Hiriart JB, Michalak S, Bail BL, Cartier V, Mouries A, Oberti F, Fouchard-Hubert I, Vergniol J, and Aube C.** Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology* 63: 1817-1827, 2016.
19. **Castera L, Forns X, and Alberti A.** Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 48: 835-847, 2008.
20. **Castera L, Vilgrain V, and Angulo P.** Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 666-675, 2013.
21. **Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, and Sanyal AJ.** The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55: 2005-2023, 2012.
22. **Chen N, Wan Z, Han SF, Li BY, Zhang ZL, and Qin LQ.** Effect of vitamin D supplementation on the level of circulating high-sensitivity C-reactive protein: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 6: 2206-2216, 2014.
23. **Chon YE, Jung KS, Kim SU, Park JY, Park YN, Kim DY, Ahn SH, Chon CY, Lee HW, Park Y, and Han KH.** Controlled attenuation parameter (CAP) for detection of hepatic steatosis in patients with chronic liver diseases: a prospective study of a native Korean population. *Liver Int* 34: 102-109, 2014.
24. **Chung GE, Kim D, Kwak MS, Yang JI, Yim JY, Lim SH, and Itani M.** The serum vitamin D level is inversely correlated with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and molecular hepatology* 22: 146-151, 2016.
25. **Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, and Pons-Romero F.** Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 34: 1158-1163, 2001.
26. **Dajani A, and AbuHammour A.** Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Where do we stand? an overview. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association* 22: 91-105, 2016.
27. **Dasarathy J, Periyalwar P, Allampati S, Bhinder V, Hawkins C, Brandt P, Khiyami A, McCullough AJ, and Dasarathy S.** Hypovitaminosis D is associated with increased whole body fat mass and greater severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 34: e118-127, 2014.
28. **de Ledinghen V, Vergniol J, Foucher J, Merrouche W, and le Bail B.** Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int* 32: 911-918, 2012.
29. **Dhalla S, and Kopec JA.** The CAGE questionnaire for alcohol misuse: a review of reliability and validity studies. *Clin Invest Med* 30: 33-41, 2007.

30. **Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, Leblanc M, Coulter S, He M, Scott C, Lau SL, Atkins AR, Barish GD, Gunton JE, Liddle C, Downes M, and Evans RM.** A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell* 153: 601-613, 2013.
31. **Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, and Maerz W.** Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine* 168: 1340-1349, 2008.
32. **Dongiovanni P, Lanti C, Riso P, and Valenti L.** Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of nutritional biochemistry* 29: 1-11, 2016.
33. **Dybek I, Bischof G, Grothues J, Reinhardt S, Meyer C, Hapke U, John U, Broocks A, Hohagen F, and Rumpf HJ.** The reliability and validity of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) in a German general practice population sample. *Journal of studies on alcohol* 67: 473-481, 2006.
34. **Eliades M, and Spyrou E.** Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World journal of gastroenterology* 21: 1718-1727, 2015.
35. **Eliades M, Spyrou E, Agrawal N, Lazo M, Brancati FL, Potter JJ, Koteish AA, Clark JM, Guallar E, and Hernaez R.** Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 38: 246-254, 2013.
36. **European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, and European Association for the Study of O.** EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64: 1388-1402, 2016.
37. **Ewing JA.** Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *Jama* 252: 1905-1907, 1984.
38. **Fabbrini E, Sullivan S, and Klein S.** Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51: 679-689, 2010.
39. **Foroughi M, Maghsoudi Z, and Askari G.** The effect of vitamin D supplementation on blood sugar and different indices of insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Iranian journal of nursing and midwifery research* 21: 100-104, 2016.
40. **Foroughi M, Maghsoudi Z, Ghiasvand R, Iraj B, and Askari G.** Effect of Vitamin D Supplementation on C-reactive Protein in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver. *International journal of preventive medicine* 5: 969-975, 2014.
41. **Gascon-Barre M, Demers C, Mirshahi A, Neron S, Zalzal S, and Nanci A.** The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology* 37: 1034-1042, 2003.
42. **George N, Kumar TP, Antony S, Jayanarayanan S, and Paulose CS.** Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *The British journal of nutrition* 108: 1410-1418, 2012.
43. **Godala M, Materek-Kusmierkiewicz I, Moczulski D, Szatko F, Gaszynska E, Tokarski S, and Kowalski J.** [Estimation of plasma 25(OH)D vitamin deficiency in patients with metabolic syndrome]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 40: 288-291, 2016.
44. **Gonzalez-Molero I, Rojo-Martinez G, Morcillo S, Gutierrez C, Rubio E, Perez-Valero V, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Almaraz MC, Colomo N, Oliveira G, and Soriguer F.** Hypovitaminosis D and incidence of obesity: a prospective study. *European journal of clinical nutrition* 67: 680-682, 2013.

45. **Gorman S, Black LJ, Feelisch M, Hart PH, and Weller R.** Can skin exposure to sunlight prevent liver inflammation? *Nutrients* 7: 3219-3239, 2015.
46. **Guasch A, Bullo M, Rabassa A, Bonada A, Del Castillo D, Sabench F, and Salas-Salvado J.** Plasma vitamin D and parathormone are associated with obesity and atherogenic dyslipidemia: a cross-sectional study. *Cardiovascular diabetology* 11: 149, 2012.
47. **Han SS, Kim M, Lee SM, Lee JP, Kim S, Joo KW, Lim CS, Kim YS, and Kim DK.** Association between body fat and vitamin D status in Korean adults. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 23: 65-75, 2014.
48. **Hatton J, Burton A, Nash H, Munn E, Burgoyne L, and Sheron N.** Drinking patterns, dependency and life-time drinking history in alcohol-related liver disease. *Addiction* 104: 587-592, 2009.
49. **Heaney RP.** Vitamin D--baseline status and effective dose. *The New England journal of medicine* 367: 77-78, 2012.
50. **Hochrath K, Stokes CS, Geisel J, Pollheimer MJ, Fickert P, Dooley S, and Lammert F.** Vitamin D modulates biliary fibrosis in ABCB4-deficient mice. *Hepatology international* 8: 443-452, 2014.
51. **Holick MF.** Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 19: 73-78, 2009.
52. **Jablonski KL, Jovanovich A, Holmen J, Targher G, McFann K, Kendrick J, and Chonchol M.** Low 25-hydroxyvitamin D level is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 23: 792-798, 2013.
53. **Kanuri G, Ladurner R, Skibovskaya J, Spruss A, Konigsrainer A, Bischoff SC, and Bergheim I.** Expression of toll-like receptors 1-5 but not TLR 6-10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 35: 562-568, 2015.
54. **Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Ledinghen V, Kumar M, Lupsor-Platon M, Han KH, Cardoso AC, Ferraioli G, Chan WK, Wong VW, Myers RP, Chayama K, Friedrich-Rust M, Beaugrand M, Shen F, Hiriart JB, Sarin SK, Badea R, Jung KS, Marcellin P, Filice C, Mahadeva S, Wong GL, Crotty P, Masaki K, Bojunga J, Bedossa P, Keim V, and Wiegand J.** Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* 66: 1022-1030, 2017.
55. **Kasapoglu B, Turkay C, Yalcin KS, Carlioglu A, Sozen M, and Koktener A.** Low vitamin D levels are associated with increased risk for fatty liver disease among non-obese adults. *Clin Med* 13: 576-579, 2013.
56. **Keating SE, Hackett DA, George J, and Johnson NA.** Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 57: 157-166, 2012.
57. **Kitson MT, Pham A, Gordon A, Kemp W, and Roberts SK.** High-dose vitamin D supplementation and liver histology in NASH. *Gut* 65: 717-718, 2016.
58. **Kwok RM, Torres DM, and Harrison SA.** Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatology* 58: 1166-1174, 2013.
59. **Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gomez J, Lillenthal Heitmann B, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirlich M, Scharfetter H, A MWJS, Pichard C, and Espen.** Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 23: 1430-1453, 2004.

60. **Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, and Heaney RP.** Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 85: 1586-1591, 2007.
61. **Lee JY, Kim KM, Lee SG, Yu E, Lim YS, Lee HC, Chung YH, Lee YS, and Suh DJ.** Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 47: 239-244, 2007.
62. **Lee SM, Jun DW, Cho YK, and Jang KS.** Vitamin D deficiency in non-alcoholic fatty liver disease: The chicken or the egg? *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 36: 191-197, 2017.
63. **Lee SS, and Park SH.** Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* 20: 7392-7402, 2014.
64. **Li LH, Zhang L, Pan SY, Wu XH, and Yin XY.** No Significant Association Between Vitamin D and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Chinese Population. *Digestive diseases and sciences* 58: 2376-2382, 2013.
65. **Loomba R, and Cortez-Pinto H.** Exercise and improvement of NAFLD: Practical recommendations. *J Hepatol* 63: 10-12, 2015.
66. **Loomba R, and Sanyal AJ.** The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 686-690, 2013.
67. **Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, and Oh BJ.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings* 55: 434-438, 1980.
68. **Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Masciana R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, and Grieco A.** Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49: 1877-1887, 2009.
69. **Miyata Y, and Shimomura I.** [Vitamin D, obesity, and diabetes: new technology toward drug development against metabolic diseases]. *Clinical calcium* 26: 385-391, 2016.
70. **Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, Shiffman ML, Stravitz RT, and Sanyal AJ.** Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 37: 1286-1292, 2003.
71. **Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, McGilvray ID, and Allard JP.** Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 58: 120-127, 2013.
72. **Munteanu MA, Nagy GA, and Mircea PA.** Current Management of NAFLD. *Clujul medical* 89: 19-23, 2016.
73. **Nakano T, Cheng YF, Lai CY, Hsu LW, Chang YC, Deng JY, Huang YZ, Honda H, Chen KD, Wang CC, Chiu KW, Jawan B, Eng HL, Goto S, and Chen CL.** Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J Hepatol* 55: 415-425, 2011.
74. **Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarthy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J, Brunt EM, Kleiner DE, Doo E, and Network NCR.** Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* 385: 956-965, 2015.

75. **Neyestani TR, Nikooyeh B, Alavi-Majd H, Shariatzadeh N, Kalayi A, Tayebinejad N, Heravifard S, Salekzamani S, and Zahedirad M.** Improvement of vitamin D status via daily intake of fortified yogurt drink either with or without extra calcium ameliorates systemic inflammatory biomarkers, including adipokines, in the subjects with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97: 2005-2011, 2012.
76. **Obika M, and Noguchi H.** Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Experimental diabetes research* 2012: 145754, 2012.
77. **Omran Z.** Obesity: Current Treatment and Future Horizons. *Mini reviews in medicinal chemistry* 17: 51-61, 2017.
78. **Pereira-Santos M, Costa PR, Assis AM, Santos CA, and Santos DB.** Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 16: 341-349, 2015.
79. **Pittas AG, Lau J, Hu FB, and Dawson-Hughes B.** The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92: 2017-2029, 2007.
80. **Reeves HL, Zaki MY, and Day CP.** Hepatocellular Carcinoma in Obesity, Type 2 Diabetes, and NAFLD. *Digestive diseases and sciences* 61: 1234-1245, 2016.
81. **Rhee EJ, Kim MK, Park SE, Park CY, Baek KH, Lee WY, Kang MI, Park SW, Kim SW, and Oh KW.** High serum vitamin D levels reduce the risk for nonalcoholic fatty liver disease in healthy men independent of metabolic syndrome. *Endocrine journal* 60: 743-752, 2013.
82. **Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, Drebber U, Geier A, Hampe J, Hellerbrand C, Pathil-Warth A, Schattenberg JM, Schramm C, Seitz HK, Stefan N, Tacke F, Tannapfel A, Lynen Jansen P, and Bojunga J.** Nicht- alkoholische Fettlebererkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 2015.
83. **Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, and Hobbs HH.** Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics* 40: 1461-1465, 2008.
84. **Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, Yeh MM, Nelson JE, and Kowdley KV.** Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 55: 1103-1111, 2012.
85. **Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, and Marcos A.** One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 8: 1114-1122, 2002.
86. **Sasso M, Miette V, Sandrin L, and Beaugrand M.** The controlled attenuation parameter (CAP): a novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36: 13-20, 2012.
87. **Sasso M, Tengher-Barna I, Ziol M, Miette V, Fournier C, Sandrin L, Poupon R, Cardoso AC, Marcellin P, Douvin C, de Ledinghen V, Trinchet JC, and Beaugrand M.** Novel controlled attenuation parameter for noninvasive assessment of steatosis using Fibroscan((R)): validation in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 19: 244-253, 2012.

88. **Schuppan D, and Schattenberg JM.** Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of gastroenterology and hepatology* 28 Suppl 1: 68-76, 2013.
89. **Seki E, and Brenner DA.** Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 48: 322-335, 2008.
90. **Sharifi N, Amani R, Hajiani E, and Cheraghian B.** Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine* 47: 70-80, 2014.
91. **Skaaby T, Husemoen LL, Borglykke A, Jorgensen T, Thuesen BH, Pisinger C, Schmidt LE, and Linneberg A.** Vitamin D status, liver enzymes, and incident liver disease and mortality: a general population study. *Endocrine* 47: 213-220, 2014.
92. **Stokes CS, Grunhage F, Baus C, Volmer DA, Wagenpfeil S, Riemenschneider M, and Lammert F.** Vitamin D supplementation reduces depressive symptoms in patients with chronic liver disease. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 35: 950-957, 2016.
93. **Stokes CS, Volmer DA, Grunhage F, and Lammert F.** Vitamin D in chronic liver disease. *Liver Int* 33: 338-352, 2013.
94. **Streba LA, Vere CC, Rogoveanu I, and Streba CT.** Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question. *World journal of gastroenterology* 21: 4103-4110, 2015.
95. **Sumida Y, Nakajima A, and Itoh Y.** Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology* 20: 475-485, 2014.
96. **Tannapfel A DH-P, Lohse A.** Indikationen zur Leberbiopsie. *Deutsche Ärzteblatt Jg 109 Heft 27-28 9 Juli 2012* 2012.
97. **Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, and Arcaro G.** Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 17: 517-524, 2007.
98. **Temple JL, Cordero P, Li J, Nguyen V, and Oben JA.** A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence. *International journal of molecular sciences* 17: 2016.
99. **Wang DQ, Portincasa P, and Neuschwander-Tetri BA.** Steatosis in the liver. *Comprehensive Physiology* 3: 1493-1532, 2013.
100. **Wang X, Li WP, Zhang Y, Yang Y, and Qin GJ.** Association between vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: results from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8: 17221-17234, 2015.
101. **Wang Y, Fan Q, Wang T, Wen J, Wang H, and Zhang T.** Controlled attenuation parameter for assessment of hepatic steatosis grades: a diagnostic meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8: 17654-17663, 2015.
102. **Wareham NJ, Jakes RW, Rennie KL, Schuit J, Mitchell J, Hennings S, and Day NE.** Validity and repeatability of a simple index derived from the short physical activity questionnaire used in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public health nutrition* 6: 407-413, 2003.
103. **Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, and Harrison SA.** Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing

- ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 140: 124-131, 2011.
104. **World Health Organization.** Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization technical report series* 894: i-xii, 1-253, 2000.
 105. **Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, and Holick MF.** Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72: 690-693, 2000.
 106. **Yao Y, Zhu L, He L, Duan Y, Liang W, Nie Z, Jin Y, Wu X, and Fang Y.** A meta-analysis of the relationship between vitamin D deficiency and obesity. *Int J Clin Exp Med* 8: 2015.
 107. **Yilmaz Y.** Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther* 36: 815-823, 2012.
 108. **Yilmaz Y, Ergelen R, Akin H, and Imeryuz N.** Noninvasive detection of hepatic steatosis in patients without ultrasonographic evidence of fatty liver using the controlled attenuation parameter evaluated with transient elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 25: 1330-1334, 2013.
 109. **Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, and Wymer M.** Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64: 73-84, 2016.
 110. **Zhang A, Wang Y, Xie H, and Zheng S.** Calcitriol inhibits hepatocyte apoptosis in rat allograft by regulating apoptosis-associated genes. *International immunopharmacology* 7: 1122-1128, 2007.
 111. **Zhou J, Zhao LJ, Watson P, Zhang Q, and Lappe JM.** The effect of calcium and vitamin D supplementation on obesity in postmenopausal women: secondary analysis for a large-scale, placebo controlled, double-blind, 4-year longitudinal clinical trial. *Nutr Metab (Lond)* 7: 62, 2010.
 112. **Zuniga S, Firrincieli D, Housset C, and Chignard N.** Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35: 295-302, 2011.

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden als Originalarbeit veröffentlicht und im Rahmen nationaler und internationaler Kongresse und Tagungen vorgestellt.

Publikation:

- ***Effect of short-term Vitamin D correction on hepatic steatosis as Quantified by controlled attenuation parameter (CAP)***

Ifigeneia Papapostoli, Frank Lammert, Caroline S. Stokes

J Gastrointestin Liver Dis, June 2016 Vol. 25 No 2: 175-181

Kongressbeiträge:

- **Poster: 70. Jahrestagung der DGVS, September 2015, Leipzig**
Short-term vitamin D supplementation improves hepatic steatosis as quantified by controlled attenuation parameter (CAP)

Ifigeneia Papapostoli, Frank Lammert, Caroline S. Stokes

Zeitschrift für Gastroenterologie, 53: KG080

- **Vortrag: International Liver Congress, April 2015, Wien**
Short term vitamin D supplementation improves hepatic steatosis as quantified by controlled attenuation parameter (CAP)

Ifigeneia Papapostoli, Frank Lammert, Caroline S. Stokes

Journal of Hepatology, 62:S211

- **Poster: Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Januar 2016, Düsseldorf**

Six-month vitamin D replacement reduces hepatic steatosis in the absence of weight loss

Ifigeneia Papapostoli, Frank Lammert, Caroline S. Stokes

Zeitschrift für Gastroenterologie, 53:A2-9

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich beim Zustandekommen meiner Promotion unterstützt und mir diese ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Frank Lammert für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation.

Ganz nachdrücklich danke ich Frau Dr. Caroline Stokes für die kompetente und nette Betreuung, ihre kontinuierliche Unterstützung sowie ihre Präsenz in allen Phasen meiner Promotion. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Bei meiner Mutter und meinen Schwestern bedanke ich mich ganz herzlich, da sie mir das Medizinstudium ermöglicht und zu jeder Zeit Rückhalt sowie Zuspruch gegeben haben, und ebenso Dank an meinen Vater, der sich aus dem Himmel über meine Dissertation freut.

An meine Schwiegereltern richte ich meinen speziellen Dank, denn durch ihre Unterstützung im familiären Bereich haben sie mir das Schreiben meiner Dissertation ermöglicht.




Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen und Mitarbeitern Frau Anita Arslanow, Herrn Horst Diehl, Frau Susanne Gatter, Frau Miluse Hemmer, Frau Pervin Ikisivri, Frau Ute Kemnade, Frau Maria Kompouri, Frau Andreani Koutsou, Frau Vassiliki Mittag-Roussou, Frau Birgit Scheidweiler, Frau Stefanie Schneider, Herrn Prof. Dr. Erich-Franz Solomayer und Frau Annelene Sutter für ihre Unterstützung bei der Arbeit und der Verständigung mit dem Patientenkollektiv sowie bei der Durchführung der Studie.

Ein Dank gebührt allen Patienten, die an der Studie Interesse zeigten, sowohl denen, die in die Studie eingeschlossen, als auch denjenigen, die ausgeschlossen werden mussten, und ganz besonders den 40 Patienten, die mit Freude, Geduld und Zuverlässigkeit teilgenommen haben.

Am Ende möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Panagiotis bedanken. Seine Geduld, seine Ratschläge und seine ständige Motivationshilfe haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Unseren kleinen Kindern Christos und Lamprini gebührt großer Dank für ihre Geduld und Inspiration.

11. APPENDIX

11.1 AUDIT/Cage-Fragebogen

0,3 l Bier	0,1 l Wein	40 ml Spirituosen
		

Bitte kreuzen Sie an, was für Sie am ehesten zutrifft

Punkte:	0	1	2	3	4
1. Wie oft nehmen Sie alkoholische Getränke zu sich?	Nie	1 mal im Monat oder seltener	2-4 mal im Monat	2-3 mal pro Woche	4 mal oder öfters pro Woche
2. Wie viele Standarddrinks trinken Sie an einem Tag, an welchem Sie alkoholische Getränke konsumieren?	1 - 2	3 - 4	5 - 6	9	10 oder mehr
3. Wie häufig trinken Sie 6 oder mehr Standarddrinks an einem einzigen Anlass?	Nie	seltener als 1 mal pro Monat	1 mal pro Monat	1 mal pro Woche	täglich oder fast täglich
4. Wie oft stellten Sie im Verlauf der letzten 12 Monate fest, dass Sie mit dem Trinken nicht mehr aufhören können, wenn Sie einmal damit angefangen haben?	Nie	seltener als 1 mal pro Monat	1 mal pro Monat	1 mal pro Woche	täglich oder fast täglich
5. Wie oft hinderte Sie im Verlauf der letzten 12 Monate Ihr Alkoholkonsum, das zu tun, was von Ihnen erwartet wurde?	Nie	seltener als 1 mal pro Monat	1 mal pro Monat	1 mal pro Woche	täglich oder fast täglich
6. Wie häufig habe Sie im Verlauf der letzten 12 Monate am Morgen ein erstes Glas Alkohol getrunken, um in Gang zu kommen, nachdem Sie am Vortag viel getrunken hatten?	Nie	seltener als 1 mal pro Monat	1 mal pro Monat	1 mal pro Woche	täglich oder fast täglich
7. Wie oft empfanden Sie in den letzten 12 Monaten Schuld- oder Reuegefühle, nachdem Sie getrunken hatten?	Nie	seltener als 1 mal pro Monat	1 mal pro Monat	1 mal pro Woche	täglich oder fast täglich
8. Wie oft war es Ihnen in den letzten 12 Monaten unmöglich, sich an das zu erinnern, was am Vorabend geschah, weil Sie getrunken hatten?	Nie	seltener als 1 mal pro Monat	1 mal pro Monat	1 mal pro Woche	täglich oder fast täglich
9. Sind Sie oder jemand anderer schon einmal verletzt worden, weil Sie getrunken hatten?	Nein		Ja, aber nicht in den letzten 12 Monaten		Ja, in den letzten 12 Monaten
10. Hat sich ein(e) Angehörige, ein(e) Freund(in), ein(e) Arzt (Ärztin) oder eine andere Person aus dem Gesundheitsbereich schon einmal besorgt über Ihren Alkoholkonsum geäußert oder vorgeschlagen, dass Sie den Konsum einschränken sollten?	Nein		Ja, aber nicht in den letzten 12 Monaten		Ja, in den letzten 12 Monaten

Gesamtpunktzahl

Bitte antworten Sie „Ja“ oder „Nein“:

1. Haben Sie schon einmal das Gefühl gehabt, dass Sie weniger Alkohol trinken sollten?

Ja ☐ Nein ☐

2. Haben Sie sich schon einmal geärgert, dass andere Ihr Trinkverhalten kritisiert haben?

Ja ☐ Nein ☐

3. Haben Sie sich wegen Ihres Alkoholkonsums schon einmal schlecht oder schuldig gefühlt?

Ja ☐ Nein ☐

4. Haben Sie jemals bereits morgens Alkohol getrunken, um Ihre Nerven zu beruhigen oder einen Kater loszuwerden?

Ja ☐ Nein ☐

